N° D'ORDRE

491

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Claudine BOLLACK

Ingénieur - Chimiste E. S. C. I. L.
Licenciée ès - Sciences
Attachée de Recherches au C. N. R. S.

1ère THÈSE - ***Étude de la Méthylation et de l'Allylation des acides Ribonucléiques***

2ème THÈSE - ***Propositions données par la Faculté***

Soutenues le 30 Novembre 1968 devant la Commission d'examen

MM.	L.	HIRTH	*Président*
	J. P.	EBEL	*Examinateurs*
	J. H.	WEIL	
	L.	COLOBERT	
	G.	DIRHEIMER	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547012_0023

N° d'ordre : 491

T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

par

Claudine BOLLACK

Ingénieur Chimiste E. S. C. I. L.
Licenciée ès-Sciences
Attachée de Recherches au C. N. R. S.

Première thèse

ETUDE DE LA METHYLATION ET DE L'ALLYLATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

Deuxième thèse

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

Soutenues le 30 novembre 1968 devant la Commission d'Examen :

MM.	L. HIRTH	Président
	J. P. EBEL	Examinateur
	J. H. WEIL	"
	L. COLOBERT	"
	G. DIRHEIMER	"

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

FACULTE DE STRASBOURG
UNIVERSITE DE STRASBOURG
FACULTE DES SCIENCES

Edition de Janvier 1968

Doyen : Professeur J. H. VIVIEN

Doyens Honoraires : A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H. J. MARESQUELLE, G. MILLOT

Professeurs Honoraires : P. DE BEAUCHAMP, L. BOISSELET, H. CARTAN, G. CERF, C. CHABAUTY, A. CHRETIEN, J. DENY, Ch. EHRESMANN, M. FRECHET, Mlle S. GILLET, A. HEE, R. HOCART, A. KIRRMANN, G. LEMEE, P. L'HERITIER, A. LICHNEROWICZ, L. NEEL, Ch. SADRON, E. TERROINE, R. THIRY, H. VILLAT, H. WEISS, Et. WOLFF, J. YVON.

Maître de Conférences Honoraire : R. WEIL

Professeurs :

H. J. MARESQUELLE	T.	Biologie végétale
A. ROUSSEL	T.	Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions
H. FORESTIER	T.	Chimie générale
J. ROTHE	T.	Physique du Globe
P. LACROUTE	T.	Astronomie
J. H. VIVIEN	T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
A. MAILLARD	T.	Physicochimie du Pétrole
S. GORODETZKY	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L. SACKMANN	T.	Mécanique des Fluides
J. BYE	T.	Chimie Physique
R. LOMBARD	T.	Chimie organique
Mlle M. PEREY	T.	Chimie nucléaire
S. GOLDSZTAUB	T.	Minéralogie et Pétrographie
P. JOLY	T.	Biologie générale
H. BENOIT	T.	Physicochimie macromoléculaire
P. CUER	T.	Physique générale et Physique corpusculaire
G. MILLOT	T.	Géologie et Paléontologie
R. LECOLAZET	T. T. P.	Physique du Globe
H. SAUCIER	T. T. P.	Minéralogie
R. ROHMER	T.	Chimie minérale
Mlle A. GAGNIEU	T. T. P.	Botanique
S. NIKITINE	T.	Physique générale
F. STUTINSKY	T.	Physiologie générale
B. WURTZ	T. T. P.	Chimie biologique
J. BRENET	T.	Electrochimie
G. OURISSON	T. T. P.	Chimie
A. COCHE	T. T. P.	Physique nucléaire

R. CERF	T.	Physique générale
J. FRENKEL	T. T. P.	Mathématiques
P. TAGLANG	T.	Physique
J. H. LONCHAMP	T. T. P.	Physique
A. DELUZARCHE	T. T. P.	Chimie
J. B. DONNET	T. T. P.	Chimie Physique
R. ARMBRUSTER	T. T. P.	Physique
A. ROCHE	T. T. P.	Physique du Globe
L. HIRTH	T.	Microbiologie
A. SIGOT	P. S. C.	Zoologie
J. COGNE	T. T. P.	Géologie
A. FUCHS	T.	Mécanique rationnelle
A. GALLMANN	T. T. P.	Physique
F. MIALHE	T. T. P.	Physiologie animale
J. P. EBEL	T.	Chimie biologique
J. PARROD	T. T. P.	Chimie
R. WEY	T. T. P.	Chimie
Mme D. MAGNAC	T. T. P.	Physique
M. DAUNE	P. S. C.	Physique
J. P. ADLOFF	T. T. P.	Chimie nucléaire
D. BERNARD	T. T. P.	Méthodes mathématiques de la Physique
M. ZISMAN	T. T. P.	Mathématiques
E. DANIEL	T.	Physique expérimentale
P. CHEVALLIER	T.	Physique
J. GREMILLARD	T. T. P.	Mécanique des Fluides
P. CARTIER	T.	Mathématiques
G. REEB	T.	Topologie
F. NORGUET	T.	Analyse supérieure
R. CHAUVIN	T.	Psychophysiologie
J. WUCHER	P. S. C.	Physique
Mme M. BRINI	P. S. C.	Chimie
G. PERNY	P. S. C.	Physique
R. BARO	P. S. C.	Physique
H. DURANTON	P. S. C.	Botanique
R. WEISS	T. T. P.	Chimie
P. FEDERLIN	T. T. P.	Chimie
J. LERAY	P. S. C.	Physique
J. P. SCHWING	P. S. C.	Chimie
M. SIESKIND	P. S. C.	Physique
G. MONSONEGO	P. S. C.	Physique mathématique
P. GABRIEL	T. T. P.	Mathématiques
C. WIPPLER	T.	Physicochimie des Hauts Polymères Industriels
F. A. MEYER	T. T. P.	Mathématiques
G. WEILL	P. S. C.	Physique
J. M. BLOCH	T.	Chimie
A. CLAUSS	P. S. C.	Chimie
E. FOLLENIUS	P. S. C.	Zoologie
J. LUCAS	P. S. C.	Géologie
G. GLAESER	T.	Mathématiques
J. L. THIEBOLD	P. S. C.	Biologie animale

J.H. WEIL	P.S.C. Chimie Biologique
D. FOATA	P.S.C. Mathématiques

Professeurs Associés :

S.R. DE GROOT	Physique
K. VESELY	Physicochimie macromoléculaire
R. MARCHESSAULT	Physicochimie macromoléculaire
G. LUMER	Mathématiques
R. MORIARTY	Chimie organique
J. AUSLANDER	Physique corpusculaire

Maîtres de Conférences

H. DANAN	Physique
Mme WINTER Ch.	Physique
J.P. EBERHART	Minéralogie
Mme. D. CAGNIANT	Chimie
X. FERNIQUE	Mathématiques
J. STREITH	Chimie
F. GAUTIER	Physique propédeutique
G. SUTTER	Physique électronique
J.L. VERDIER	Mathématiques
J.M. LEHN	Chimie
Cl. ROBERT	Physique
Fr. LACROUTE	Biologie végétale
M. GOUNOT	Botanique
J. PRADINES	Mathématiques
A. GIRARDIE	Biologie animale
F. BECKER	Physique mathématique
J. DEHAND	Chimie minérale
Cl. GODBILLON	Mathématiques
M. KAROUBI	Mathématiques
A. MIGNOT	Mathématiques appliquées

Maîtres de Conférences Associés :

V. AVANISSIAN	Mathématiques

Secrétaire : G. SAINT-PE

INTRODUCTION

L'un des problèmes fondamentaux de la Biologie Moléculaire moderne est l'étude de la structure des acides ribonucléiques (RNA) et des relations entre les stuctures et les activités biologiques de ces molécules. Ces trois dernières années ont vu des progrès considérables dans la détermination des stuctures. Plusieurs séquences de RNA de transfert (tRNA) ont été établies (levure : $tRNA^{Ala}$, HOLLEY et coll., 1965 a ; $tRNA^{Ser}$, ZACHAU, DUTTING et FELDMANN, 1966 a et b ; $tRNA^{Tyr}$, MADISON, EVERETT et KUNG, 1966 ; $tRNA^{Val}$, BAEV et coll., 1966, 1967 ; $tRNA^{Phe}$, RAJBHANDARY et coll., 1966, 1967 ; levure torula : $tRNA^{Val}$, TAKEMURA, MIZUTANI et MIYAZAKI, 1968 ; E. coli : $tRNA^{Tyr}$: GOODMAN et coll., 1968 ; $tRNA^{Met}$, DUBE et coll., 1968 ; $tRNA^{Val}$: YANIV et BARRELL, 1968 ; foie de rat : $tRNA^{Ser}$, STAEHELIN et coll., 1968). D'autre part, déjà deux séquences de RNA ribosomal 5 S ont été déterminées : chez E. coli, par BROWNLEE, SANGER et BARRELL (1967) et dans les cellules KB par FORGET et WEISSMAN (1967). Dans certains laboratoires, on commence à étudier des structures beaucoup plus complexes comme celles du RNA ribosomal (rRNA 16 et 23 S d'E. coli : SANGER, BROWNLEE et BARRELL, 1965 ; TAKANAMI, 1967 a, b ; Mc ILREAVY et MIDGLEY, 1967) et des RNA viraux (RNA de MS 2 et TMV : voir GLITZ, BRADLEY et FRAENKEL-CONRAT, 1968).

Par contre, les connaissances concernant les relations entre la structure et l'activité biologique des RNA sont encore très fragmentaires et se limitent pratiquement aux seuls RNA de transfert.

Les déterminations de structure reposent toujours sur le même principe : digestion du RNA avec des enzymes de spécificité différente, analyse des oligonucléotides obtenus et reconstruction de la séquence par chevauchement des divers fragments.

Dans le domaine des relations entre structure et activité biologique des RNA, l'approche fondamentale est basée sur l'influence de modifications sur l'activité biologique de la molécule. Un des moyens les plus utilisés est la modification chimique d'un RNA, applicable à la fois à la détermination de sa structure et à l'étude des rapports structure - activité. Parmi les modifications chimiques très diverses qui ont été utilisées (pour une revue de la question, voir MIURA, 1967 et EBEL , 1968), nous pouvons citer les halogénations, les alcoylations, l'action de l'acide nitreux, du formol, de l'hydroxylamine, de l'acide perphtalique, de carbodiimides, de l'acrylonitrile, du bromure de cyanogène, etc.

Les réactions d'alcoylation sont particulièrement intéressantes et on déjà fait l'objet de très nombreuses études. L'administration d'agents alcoylants variés (ypérites, diméthylnitrosamine, méthane sulfonate de méthyle, . . .) présente un intérêt biologique particulier car ces agents peuvent bloquer des fonctions cellulaires fondamentales, ce qui les a fait utiliser dans la thérapeutique anticancéreuse, ou au contraire provoquer des mécanismes cancérigènes ou mutagènes. Ces réactifs agissent le plus souvent selon un processus d'alcoylation des acides nucléiques, en particulier au niveau de certains restes puriques comme la guanine (LAWLEY et BROOKES, 1963), et parfois au niveau des groupes phosphates. Des comparaisons ont pu être établies entre l'effet produit par un agent alcoylant et celui dû à un rayonnement UV (SEARASHI et STRAUSS, 1965). Dès 1955, HADDOW rappelait l'étonnante analogie observée entre les effets biologiques produits par les rayonnements ionisants et ceux dûs à des agents chimiques dits "radiomimétiques" parmi lesquels les agents alcoylants. De bonnes revues sur ce sujet ont été publiées (ROSS, 1962 ; LOVELESS, 1966 ; LAWLEY, 1966).

Mais, il faut signaler que des réactions d'alcoylation enzymatique peuvent également avoir lieu in vivo. Ces alcoylations biologiques présentent un intérêt capital car elles permettent la formation des

bases méthylées des RNA (essentiellement tRNA) et, dans certains cas, d'autres types de bases alcoylées, par exemple par un reste allyl-disubstitué comme dans l'isopenténylad énosine.

C'est dans la double optique de détermination de structure et de relations structure-activité biologique que Monsieur le Professeur EBEL nous a proposé d'étudier des réactions d'alcoylation des RNA et en particulier la méthylation et l'allylation.

Lorsque nous avons entrepris ces recherches, un certain nombre de travaux avaient déjà été publiés dans le domaine de la méthylation, mais ils ne présentaient que des points de vue relativement partiels des problèmes soulevés.

Nous nous sommes proposés d'approfondir et d'élargir cette étude et nous avons ensuite appliqué cette méthode à l'étude essentiellement d'un type de RNA : les RNA de transfert.

Notre travail comprend quatre parties. Après une revue des techniques utilisées, comprenant la mise au point de l'isolement du tRNA spécifique de la phénylalanine ($tRNA^{Phe}$), nous décrirons deux réactions d'alcoylation des RNA : la méthylation par le sulfate de méthyle et l'allylation par le bromure d'allyle. Les aspects chimiques et physicochimiques de ces modifications seront examinés. Au cours de la troisième partie de notre travail, nous envisagerons l'intérêt des réactions d'alcoylation en vue de l'analyse structurale des RNA, tant de la structure primaire que de la structure secondaire et tertiaire. Nous avons, en particulier, appliqué les méthodes ainsi préconisées à l'étude du $tRNA^{Phe}$. La quatrième partie, enfin, traitera de l'étude de certaines propriétés biologiques des tRNA modifiés, que ce soit des activités biologiques normales comme celles du tRNA au cours de la synthèse protéique (capacité acceptrice d'aminoacides par exemple) ou la possibilité d'induire la production de substances inhibant la multiplication virale. Pour ce dernier point, nous décrirons notre contribution au travail de MM. COLOBERT et LOUISOT de la Faculté de Médecine de Lyon.

Avant d'exposer nos travaux, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à Monsieur le Professeur EBEL qui nous a accueillie dans son laboratoire. Alors que nous venions du Laboratoire de Chimie Organique du Museum d'Histoire Naturelle, il a guidé notre formation de biochimiste. Tout au long de ce travail qu'il a inspiré, ses conseils et ses encouragements nous ont été extrêmement précieux.

Monsieur le Professeur HIRTH nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre Jury de thèse et nous lui en sommes très reconnaissante.

Nous tenons également à remercier Monsieur le Professeur COLOBERT, de la Faculté de Médecine de Lyon, qui a bien voulu participer à notre Jury. Une excellente collaboration entre son équipe et notre laboratoire nous a permis de prendre part à la réalisation d'un travail qui s'est révélé très intéressant.

Nos remerciements s'adressent à Monsieur le Professeur DIRHEIMER qui a bien voulu faire partie de notre Jury. Nous avons toujours apprécié ses conseils et nous lui sommes particulièrement reconnaissante de nous avoir donné la possibilité de nous familiariser avec les techniques d'isolement des tRNA spécifiques.

Nous remercions également Monsieur le Professeur WEIL qui a bien voulu faire partie de notre Jury.

Notre reconnaissance s'adresse à Mademoiselle TCHOUBAR, Directeur Scientifique au C.N.R.S., qui a bien voulu s'intéresser à la partie chimique de ce travail et nous a proposé les mécanismes réactionnels exposés dans cette thèse.

Nous tenons enfin à remercier tous nos amis du laboratoire qui ont contribué à l'élaboration de ce travail dans un climat de sympathie. Nous remercions tout particulièrement Messieurs G. KEITH et E. KLEIN pour leur collaboration au cours des études sur la méthylation du RNA et sur l'action de la ribonucléase T_1. Nos vifs remerciements vont également à Mademoiselle C. SCHMITT pour l'aide qu'elle nous a apportée et pour son dévouement.

PREMIERE PARTIE

TECHNIQUES GENERALES DE PREPARATION ET D'ANALYSE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

CHAPITRE I

PREPARATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES DE LEVURE

La majeure partie de notre travail a été réalisée sur les acides ribonucléiques de levure. Certaines recherches ont été effectuées avec un matériel différent, le RNA de cortex de rein de veau par exemple. Nous nous limiterons, dans ce chapitre, aux techniques relatives aux RNA de levure. Les RNA autres que ceux de levure seront étudiés plus loin (chapitre VIII).

A. PREPARATION DE L'ACIDE RIBONUCLEIQUE RIBOSOMAL DE LEVURE

I. CULTURE DE LA LEVURE

La levure de boulangerie Saccharomyces cerevisiae (FALA, Strasbourg) a été recultivée pendant une génération sur un milieu à base de "Yeast Extract" (DIFCO) dans les conditions décrites par WEIL et coll. (1964).

II. ACIDE RIBONUCLEIQUE RIBOSOMAL

Le rRNA a été précipité par NaCl 2 M à partir du RNA total extrait selon la méthode au dodécylsulfate-phénol à froid (MONIER et coll. , 1962) Cette technique, décrite pour le RNA d'E. coli, a été adaptée à la levure par WEIL et coll. (1964). Nous avons adopté les modifications apportées par BECK et coll. (1968) : en particulier, la deuxième extraction de la phase phénolique, décrite dans la méthode primitive, a été supprimée car elle entraîne une grande quantité de protéines (5 à 7 p. 100) qu'il est nécessaire d'éliminer ultérieurement ; par contre, nous avons effectué une deuxième extraction de la phase aqueuse par le phénol, ce qui permet d'obtenir des RNA ne contenant que 1 p. 100 environ de protéines. Les durées d'agitation ont été réduites à 2 heures pour l'extraction à partir du broyat cellulaire et à 15 minutes pour les autres extractions. Ces RNA peuvent alors être déprotéinisés par 1 ou 2 traitements selon la technique de SEVAG (SEVAG, LACKMAN et SMOLENS, 1938). Après déprotéinisation, on effectue 2 ou 3 reprécipitations par l'éthanol qui permettent l'élimination des dernières traces de phénol ou de chloroforme encore présentes et des oligonucléotides contaminants.

De plus, nous avons remplacé la bentonite par un inhibiteur soluble de la ribonucléase, le polyvinylsulfate de potassium (PVS), à une concentration de 50 µg/ml (BECK et coll., 1968).

B. ACIDES RIBONUCLEIQUES DE TRANSFERT

I. ACIDES RIBONUCLEIQUES DE TRANSFERT TOTAUX

Le sRNA, contenant l'ensemble des tRNA, a été extrait selon la méthode de MONIER, STEPHENSON et ZAMECNIK (1960), par action du phénol sur les cellules intactes. Cette extraction est complétée par un passage sur colonne de DEAE-cellulose (WEIL, 1964).

Nous avons également employé des sRNA commercialisés par BOEHRINGER (Mannheim) : sRNA de levure de bière et sRNA de levure de boulangerie.

II. ACIDE RIBONUCLEIQUE DE TRANSFERT SPECIFIQUE DE LA PHENYLALANINE ($tRNA^{Phe}$) DE LEVURE DE BIERE

Pour réaliser certaines expériences que nous décrirons dans le chapitre VI, il nous a fallu préparer un tRNA spécifique aussi pur que possible. A la même époque, dans notre laboratoire, Mme BAKES avait également à résoudre des problèmes nécessitant un tRNA spécifique ; aussi avons-nous effectué cette étude en collaboration avec Mme BAKES et Mr. DIRHEIMER. Nous avons, en premier lieu, essayé de préparer le $tRNA^{Ala}$ selon la technique de distribution en contre-courant utilisée par HOLLEY. Cependant, nous avons utilisé un matériel de départ différent de celui employé par HOLLEY, le sRNA de levure de bière dont le triplet terminal pCpCpA est intact alors que HOLLEY partait d'un sRNA de levure de boulangerie dépourvu d'adénosine terminale. Les résultats que nous avons obtenus en partant de ce matériel nous ont amenés à préparer un autre tRNA spécifique, le $tRNA^{Phe}$.

1) Matériel et Techniques expérimentales

a - Matériel

- sRNA de levure de bière (BOEHRINGER, Mannheim)
- NaH_2PO_4, H_2O (MERCK)
- formamide (puriss. - MERCK)
- isopropanol (pour analyse - MERCK)
- éther (puriss. - MERCK)
- méthylcellosolve (PROLABO)
- K_2HPO_4 (PROLABO)
- butanol (PROLABO)

b - Distribution en contre-courant

La technique utilisée est celle décrite par DIRHEIMER et EBEL (1967). La distribution en contre-courant a été effectuée en chambre thermostatée à 24° avec un appareil Post Scientific Instruments (New-York) type B 5 de 500 tubes de 10 ml de capacité dans chaque phase.

Nous avons employé le système de phases de HOLLEY et coll. (1963). Un tampon phosphate a été préparé en dissolvant 1 700 g de NaH_2PO_4, H_2O et 1 100 g de K_2HPO_4 dans 8 litres d'eau distillée. Après agitation, on a soutiré au volume obtenu (8 940 ml) 200 ml destinés à la dissolution de l'échantillon de sRNA. Ensuite, pour obtenir les deux phases, 580 ml de formamide et 2 440 ml d'isopropanol ont été ajoutés aux 8 740 ml de tampon restant. Après agitation et repos à 24°, le rapport $\frac{\text{phase organique}}{\text{phase aqueuse}}$ était de 7 : 5.

L'échantillon de sRNA à fractionner a été dissous dans 220 ml du système de solvants précédent (110 ml de chaque phase) de la façon suivante : 1,5 g de sRNA ont été dissous dans 100 ml du tampon phosphate décrit plus haut ; cette solution a été additionnée de 28 ml d'isopropanol et de 6, 7 ml de formamide. Puis, on a ajouté peu à peu des quantités de phase inférieure et de phase supérieure du système précédent jusqu'à l'obtention de 220 ml du système de 2 phases dans le rapport 1 : 1.

Les 10 premiers tubes de l'appareil de distribution en contre-courant ont été remplis chacun avec 10 ml de chaque phase de l'échantillon. Les produits insolubles de l'interphase n'ont pas été introduits dans l'appareil. Les 490 autres tubes de l'appareil ont été remplis chacun avec 10 ml de phase inférieure du système de solvants.

Une distribution en contre-courant de 1 100 transferts a été effectuée (15 agitations suivies de 10 minutes de repos, au début de l'expérience, réduites à 5 minutes en fin d'expérience). A l'extrémité des 500 tubes de l'appareil, un collecteur a recueilli les phases supérieures

en fractions de 20 ml (300 fractions en tout). Après la distribution, les premiers produits recueillis dans le collecteur avaient donc subi 500 transferts, les derniers 1 100 transferts. Les fractions restant dans l'appareil avaient également subi 1 100 transferts. Elles en ont été retirées à l'aide d'une seringue . Les densités optiques des différentes fractions organiques, diluées 3 fois avec de l'eau, ont été lues à 260 mμ dans des cuves de 5 mm de chemin optique.

Nous avons adopté la représentation graphique suivante : dans la partie gauche figurent les 500 fractions restant dans l'appareil, numérotées de 1 à 500. Dans la partie droite, nous avons fait figurer les fractions recueillies dans le collecteur et numérotées de 1 à 300 à partir de l'extrémité droite de l'axe des abscisses. De gauche à droite, les tRNA obtenus correspondent donc à des coefficients de partage $\frac{\text{phase organique}}{\text{phase aqueuse}}$ croissants. Les tRNA les plus solubles dans la phase organique seront donc situés à droite sur le graphique.

c - Récupération des tRNA à partir des fractions du contre-courant

Les tRNA ont été extraits, selon le procédé de APGAR, HOLLEY et MERRILL (1962), à partir des fractions recueillies. Nous avons utilisé des ampoules à décantation de 2 litres. On réunit le contenu de 12 tubes, on ajoute 250 ml d'éther et on agite. L'isopropanol est extrait par l'éther que l'on élimine par décantation. La phase inférieure est additionnée de 100 ml de méthylcellosolve. Après agitation, on écarte la phase inférieure (ce qui élimine les phosphates). A la phase supérieure, on ajoute 250 ml de butanol et 375 ml d'éther pour ôter la formamide et les traces de méthylcellosolve. Après 2 heures de séparation, la phase inférieure est dialysée dans des tubes VISKING de 70 cm de long et de 5 cm de diamètre. On effectue successivement 3 dialyses contre de l'eau

désionisée. La solution obtenue est concentrée à 5 ml, à la température de 25°, dans un évaporateur rotatif BUCHI (FLAVIL, Suisse). Ces 5 ml sont transvasés dans un tube à centrifuger gradué de 50 ml, le ballon est lavé et le volume final est amené à 10 ml avec les eaux de lavage. La densité optique d'une partie aliquote est mesurée après dilution au 1/20 dans le tampon $MgCl_2$ 0,02 M - Tris-HCl 0,02 M , pH 7,5.

Les solutions de tRNA sont conservées congelées à -20°. On peut également les précipiter par addition d'éthanol en présence d'ions Na^+ ou K^+, les centrifuger et les laver puis les sécher sur P_2O_5.

d - Préparation des aminoacyl-tRNA synthétases et détermination de la capacité acceptrice des tRNA

Ces techniques sont décrites dans le chapitre VII.

2) Résultats

Le profil de la densité optique après distribution en contre-courant est représenté sur la figure 1. On a testé l'activité acceptrice vis-à-vis de l'alanine (représentée sur la même figure). Les résultats ont montré que le $tRNA^{Ala}$ est celui qui migre le plus lentement (pic 8) comme dans le système décrit par HOLLEY. Mais, les activités acceptrices spécifiques obtenues n'étaient pas très élevées (10 mμmoles/mg). Si l'on prend comme poids moléculaire des tRNA la valeur de 27000, on peut calculer qu'un tRNA pur fixe 37 mμmoles d'aminoacide par mg. Ceci nous a permis de déduire que la pureté du $tRNA^{Ala}$ ne dépassait pas 27 p. 100.

Ce résultat peut s'expliquer par une migration différente des tRNA de levure de bière par rapport aux tRNA de levure de boulangerie, cette différence de comportement pouvant être due au fait que ces tRNA possèdent ou non un triplet 3'-terminal intact.

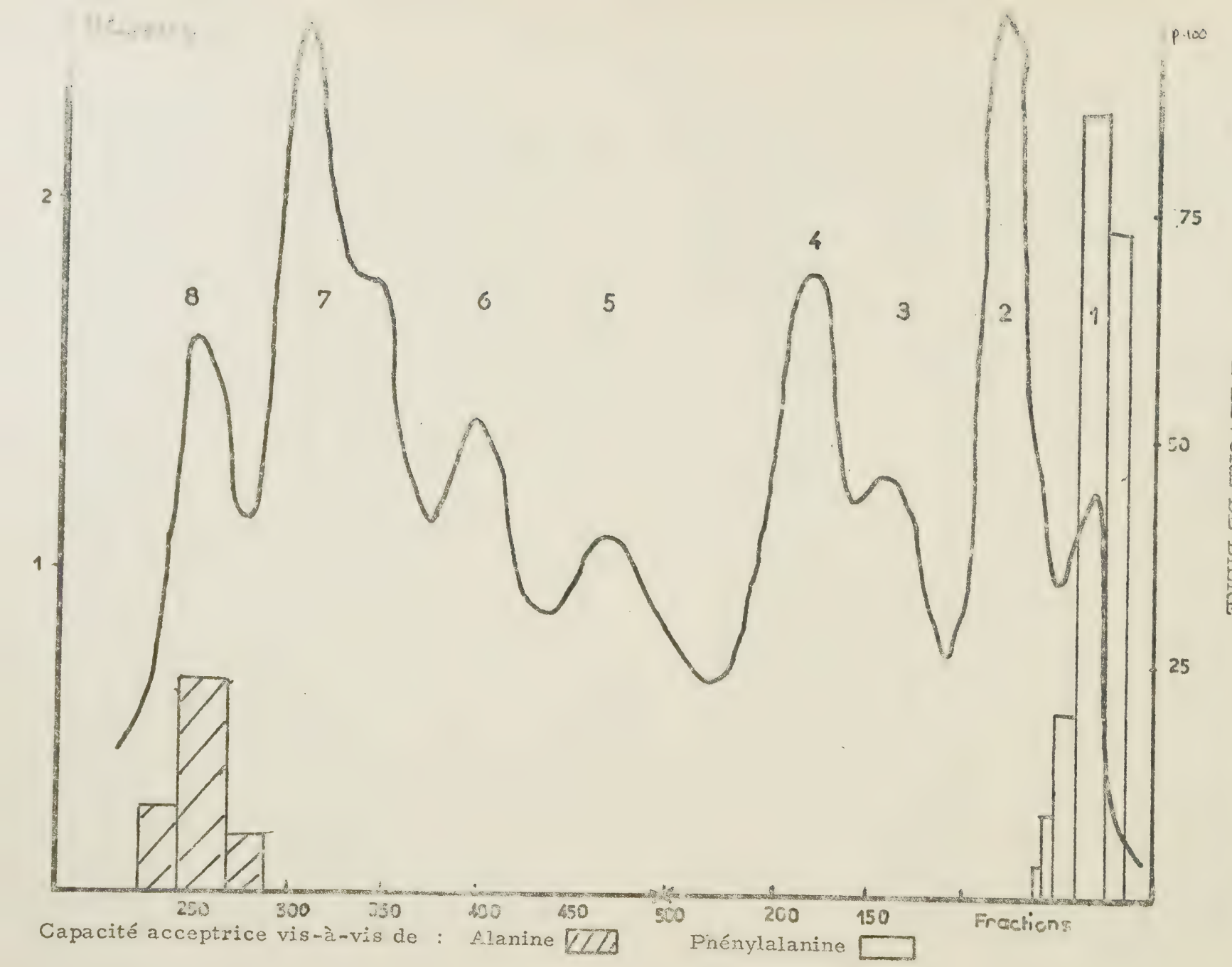


Figure 1 - DISTRIBUTION EN CONTRE-COURANT DE sRNA DE LEVURE DE BIERE

Nous nous sommes alors intéressés à la fraction qui migrait le plus rapidement (pic 1) et nous avons effectué sur cette fraction les mesures de capacité acceptrice vis-à-vis de 18 aminoacides (la cystéine et la glutamine n'ont pas été testées). On constate que seule la phénylalanine a été fixée. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 1. Une contamination par le $tRNA^{Tyr}$ a pu être décelée, de l'ordre de 1 p. 100.

Cette méthode permet donc d'obtenir, en une seule étape, un $tRNA^{Phe}$ avec un degré de pureté très élevé. Pour débarrasser le $tRNA^{Phe}$ des substances colorées qui le contaminaient, nous avons utilisé la méthode décrite par DIRHEIMER (1968) en l'adaptant au cas particulier du $tRNA^{Phe}$: le $tRNA^{Phe}$ a été chromatographié sur une colonne d'hydroxyapatite HTP (CALBIOCHEM, Los Angeles - Californie) de 60 cm de hauteur et 1 cm de diamètre, équilibrée avec un tampon phosphate pH 5,8 , 0,05 M. L'élution du $tRNA^{Phe}$ a été effectuée avec un tampon phosphate pH 5,8 - 0,2 M. Les matières colorées apparaissent dans l'éluat avant le tRNA. Dans les expériences décrites au chapitre VI, nous n'avons pas jugé utile d'effectuer ce dernier traitement.

III. DISCUSSION

Au moment où nous avons effectué ce travail, une autre méthode d'isolement du $tRNA^{Phe}$ de levure avait été décrite par HOSKINSON et KHORANA (1965). Elle nécessite trois distributions successives en contre-courant dans des conditions différentes, avec respectivement 200, 780 et 1 200 transferts. La pureté obtenue atteignait 80 p. 100 et le rendement était de 7 à 10 mg de $tRNA^{Phe}$ pour 4 g de tRNA initial. Notre méthode est donc plus avantageuse. En une seule étape, un excellent degré de pureté peut être atteint avec un rendement de 20 mg de $tRNA^{Phe}$ pour 1 g.

Signalons enfin que, tout récemment (Juillet 1968), WIMMER, MAXWELL et TENER ont mis au point une autre technique d'isolement du $tRNA^{Phe}$ de levure par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose benzoylée. Cette première étape permet d'obtenir un tRNA dont le taux est de 65 p. 100. Une deuxième chromatographie sur acide silicique recouvert de DEAE-cellulose benzoylée est nécessaire pour amener la pureté à 96 p. 100. Le rendement est de l'ordre de 1, 6 mg de RNA pour 100 mg de sRNA.

CHAPITRE II

TECHNIQUES GENERALES D'ANALYSE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

A. ANALYSE DES BASES

1) Généralités

Les RNA ont été soumis à une hydrolyse qui permette de déceler les bases modifiées au cours des réactions d'alcoylation. Nous avons essentiellement utilisé des hydrolyses de type acide. En effet, comme nous le verrons plus loin, le traitement en milieu alcalin provoque l'apparition de diverses réactions secondaires. Nous avons effectué l'analyse des bases des RNA au moyen de l'hydrolyse perchlorique qui conduit directement aux bases, ou de l'hydrolyse chlorhydrique qui fournit les bases puriques et les nucléotides pyrimidiques. L'hydrolyse chlorhydrique sera étudiée dans le chapitre VI.

2) Hydrolyse perchlorique

La technique utilisée est celle de WYATT (1951), qui met en jeu l'action de l'acide perchlorique 12 N sur le RNA pendant 1 heure à 100°. Le précipité charbonneux formé, dû à la décomposition des sucres, est repris à deux fois rapidement par une solution de KOH de façon à amener le pH aux environs de 12-13, les bases précipitant à pH 7. L'hydrolysat est ensuite acidifié à pH 1 par addition de HCl.

3) Chromatographie

L'analyse de l'hydrolysat est effectuée par chromatographie bidimensionnelle descendante, sur papier WHATMANN N°1. Sauf indications contraires, nous avons employé le système de solvants suivants :

Solvant (I) : isopropanol - HCl concentré - H_2O(170 : 41 : 39 v/v)
(solvant de WYATT). Durée de migration : 24 h.

Solvant (II) : n-butanol - NH_4OH 6 N (180 : 30 v/v)
(DUVAL, 1967). Durée de migration : 24 h.

Les chromatographies sont réalisées à 20°. Pour obtenir une bonne séparation dans le deuxième solvant, il est nécessaire de le laisser s'écouler dans la cuve. A cet effet, on découpe en dents de scie le bord inférieur de la feuille.

Après séchage à la température ambiante, les taches sont révélées par exposition à la lumière ultraviolette d'une lampe MINERALIGHT ou de l'appareil CHROMATO-VUE (modèle C 3, UV Products Inc., San Gabriel, Californie).

Les taches ainsi repérées sont découpées et éluées par 5 ml de HCl N pour les dérivés puriques et 5 ml de HCl 0,1 N pour les dérivés pyrimidiques. Si les taches sont très petites, on peut les éluer avec 3 ml. L'élution est réalisée à 37° pendant 16 heures ou à 100° pendant 10 minutes. Deux témoins sont prélevés sur la même chromatographie et traités parallèlement, l'un par HCl N, l'autre par HCl N/10. Nous avons vérifié qu'il est inutile de prendre un témoin voisin de chaque tache, car toute la surface de la feuille conduit aux mêmes valeurs d'absorption UV, excepté une petite bande de 3-4 cm de large au niveau du front du solvant.

Les bases normales ou modifiées sont identifiées par leurs spectres d'absorption UV à différents pH et par leur Rf. Dans le solvant II, nous avons calculé le $R_{adénine}$, c'est-à-dire le rapport

$$\frac{\text{distance parcourue par la tache}}{\text{distance parcourue par l'adénine}}$$

La relation $D.O._{max} = \varepsilon_{max} c$ permet d'évaluer la quantité de base contenue dans la prise d'essai avec

c = concentration en mole/litre

ε_{max} = coefficient d'absorption molaire au maximum d'absorption.

Si l'on utilise V ml d'acide pour l'élution, la quantité de base contenue dans la tache est

$$q = \frac{D.O._{max} \times V}{\varepsilon max \times 1000} \text{ moles.}$$

B. MESURE DU COEFFICIENT D'ABSORPTION MOLAIRE

1) Principe

CHARGAFF et ZAMENHOF (1948) ont défini ce coefficient par la relation

$$\varepsilon(P) = \frac{D.O. \times D}{c}$$

D.O. est la densité optique de la solution à 260 mμ

D est l'épaisseur de la cuve de quartz, en cm

c représente la concentration en phosphore, exprimée en atomes-grammes par litre = P/31.

Comme la D.O. a été lue dans une cuve de 1 cm de chemin optique et que la solution a toujours été diluée, nous avons la relation

$$\varepsilon(P) = \frac{D.O. \times \text{taux de dilution} \times 31}{P \text{ (mg/ml)}}$$

Ce coefficient $\varepsilon(P)$ permet, d'une part, d'évaluer la concentration en acide nucléique et, d'autre part, d'apprécier la dénaturation de la structure des RNA. On sait, en effet, que l'empilement des bases dans une structure hélicoïdale produit une hypochromicité. Un RNA dénaturé présente donc un $\varepsilon(P)$ plus élevé que le RNA intact.

Dans nos calculs, nous avons adopté les valeurs moyennes de 9,3 g de P pour 100 g d'acide nucléique et de 8 000 comme ε (P). Ceci nous conduit à la correspondance suivante : si $D.O._{260} = 1$, la concentration en RNA est

$$\frac{D.O. \times 31 \times 100}{8000 \times 9,3} \simeq 0,04 \text{ mg/ml}$$

2) Dosage du phosphore

Les dosages de P ont été effectués selon la méthode de BRIGGS et selon la microméthode de AMES et DUBIN.

La méthode de BRIGGS (1922) comporte une minéralisation sulfonitrique. Le phosphore, libéré sous forme d'orthophosphate, est transformé en phosphomolybdate, celui-ci est réduit en bleu de molybdène par l'hydroquinone en présence de sulfite de sodium. Cette technique permet de doser des quantités de P entre 50 et 400 µg.

La méthode de AMES et DUBIN (1960) est une microméthode qui permet de doser 0,1 à 0,5 µg de P, soit 1 à 5 µg de RNA. Sur la même solution, on peut déterminer la densité optique et la teneur en phosphore, ce qui élimine un facteur d'erreur, celui dû à la dilution nécessaire pour mesurer la densité optique. Par contre, comme toute microméthode, elle exige un soin particulier et un matériel d'une propreté rigoureuse. La minéralisation est réalisée à l'aide de nitrate de magnésium. Le principe du dosage colorimétrique est le même que dans la méthode de BRIGGS, mais l'acide ascorbique est utilisé comme réducteur à la place de l'hydroquinone. Etant donné l'intérêt de cette méthode, qui est relativement peu employée dans les dosages biochimiques, nous en donnons ici la description détaillée.

Méthode de AMES et DUBIN

a - Minéralisation

Dans un tube à hémolyse en Pyrex, on met 0,10 ml de solution de RNA (0,030 à 0,040 µg/ml). On ajoute exactement 0,025 ml de $Mg(NO_3)_2$ à 10 p.100 dans l'éthanol absolu. On chauffe en agitant le tube dans le cône bleu de la flamme d'un bec Bunsen jusqu'à disparition des fumées rousses (environ 30 secondes). Lorsque les tubes sont refroidis, on ajoute 0,3 ml de HCl 0,5 N et on pose une bille de verre sur leur ouverture. On les porte au bain-marie bouillant pendant 15 minutes pour hydrolyser le pyrophosphate éventuellement formé. Tout le phosphore se trouve alors sous forme d'orthophosphate.

b - Dosage colorimétrique : Aux tubes refroidis, on ajoute 0,7 ml d'un mélange fraîchement préparé de 1 volume de solution aqueuse d'acide ascorbique à 10 p.100 (solution que l'on peut conserver 1 mois à 4°) et de 6 volumes de molybdate d'ammonium, 4 H_2O à 0,42 p.100 dans H_2SO_4 N (solution stable à 20°). Les tubes sont bouchés avec une bille de verre et on les porte 1 heure au bain-marie à 37°. La lecture de la densité optique est faite contre de l'eau distillée, à 820 mµ, à l'aide d'un spectrophotomètre Zeiss, dans des cuves de 1 cm d'épaisseur. On effectue, en même temps, 3 essais pour chaque échantillon, un blanc avec le même volume de solvant du RNA (blanc que l'on soustrait des valeurs obtenues avec le RNA), et une courbe d'étalonnage avec 0,005 - 0,010 et 0,020 µmoles de phosphore. La solution étalon est une solution aqeuse de KH_2PO_4 à 0,1 µmole/ml.

C. ULTRACENTRIFUGATION

Les RNA ont été soumis à des centrifugations en gradient de saccharose et à des ultracentrifugations analytiques.

1) Centrifugation dans un gradient linéaire de concentration de saccharose

Cette technique, décrite par GROS et coll. (1961), est actuellement d'une utilisation extrêmement courante. On réalise, dans un tube "Lusteroïd" du rotor SW 25 de la centrifugeuse SPINCO, un gradient linéaire de concentration de Saccharose de 20 à 5 p. 100. Les solutions de saccharose sont effectuées dans un tampon acétate - acide acétique 0,01 M, pH 5, rendu 0,1 M en NaCl. Elles sont traitées par 1/100 de volume de suspension de bentonite à 2,5 p. 100 et centrifugées avant d'être utilisées (ce dernier traitement, destiné à éliminer les ribonucléases, peut être remplacé par l'addition de polyvinylsulfate de potassium à raison de 50 µg/ml). Dans le compartiment mélangeur, on introduit 12 ml de solution à 20 p. 100 et dans le compartiment réservoir 12 ml de solution à 5 p. 100. Le gradient étant constitué, on dépose avec soin un film de solution aqueuse de RNA (de préférence dialysée contre le tampon acétate - acide acétique précédent) de 1 ml au maximum. La centrifugation dure 14 heures à 24 000 tours/minute. Après ponction du fond du tube, avec une aiguille, des fractions de 10 gouttes sont prélevées puis diluées avec 2 ml d'eau distillée et leur densité optique à 260 mµ est lue au spectrophotomètre Zeiss.

On peut également utiliser le rotor SW 40. Dans ce cas, le gradient est réalisé avec 2,3 ml de chaque solution et on ajoute 0,2 ml de solution de RNA. La centrifugation, à 40 000 tours/minute, est alors réduite à 5 heures. On recueille 2 gouttes par fraction.

Nous avons représenté les diagrammes obtenus en fonction de la concentration de saccharose déterminée graphiquement pour chaque tube et non en fonction du nombre de fractions, celui-ci étant variable d'un tube à l'autre.

2) Ultracentrifugation analytique

a - Mesure des constantes de sédimentation

La constante de sédimentation d'une particule dépend de sa masse moléculaire, de ses dimensions et de sa forme. Pour la déterminer, nous avons utilisé l'ultracentrifugeuse analytique SPINCO, modèle E, équipée soit du système d'absorption dans l'UV, soit du dispositif optique de SCHLIEREN. Dans le premier cas, les plaques ont été analysées à l'aide du densitomètre Chromoscan JOYCE-LOEBL.

Les mesures ont été effectuées sur des solutions de RNA dans NaCl 0,1 M ($D.O._{260} = 0,8 \pm 0,2$ pour l'UV, 2 mg/ml pour la méthode de SCHLIEREN). Les cellules, en Kel F, ont été centrifugées à 20° (sinon, nous avons tenu compte des corrections de température). Les conditions dans lesquelles nous avons opéré permettent de négliger d'extrapoler à concentration nulle dans le cas de la méthode UV (EIGNER, SCHILDKRAUT et DOTY, 1962).

La relation de SVEDBERG et PEDERSEN (1940) permet d'apporter les corrections de température et de viscosité pour obtenir une valeur standard correspondant à un solvant de référence dont la viscosité et la densité sont celles de l'eau à 20°:

$$Sw_{20} = S_t \frac{\eta_0 t}{\eta_0 20} \times \frac{\eta t}{\eta_0 t} \times \frac{1 - V_{20^\circ} \rho_{20^\circ}}{1 - V_t \rho_t} \qquad (1)$$

η_0 = viscosité de l'eau

η = viscosité de la solution d'acide nucléique dans NaCl 0,1 M

v = volume spécifique partiel

ρ_{20° = densité de l'eau à 20°

ρ_t = densité du solvant à la température de l'expérience

La constante de sédimentation est exprimée en unités SVEDBERG ($1 S = 10^{-13}$ seconde).

b - Distribution des constantes de sédimentation

Cette fonction, g(S), permet d'apprécier l'importance de la polydispersité des particules étudiées. On peut déterminer cette distribution à l'aide de la relation de SCHACHMAN (1959) :

$$g(S) = \frac{1}{C_o} \frac{dC}{ds} = x \left(\frac{x}{x_o}\right)^2 \frac{dC}{C_o\, dx} \omega^2 t \qquad (2)$$

Nous calculerons :

$$g(S) = x \left(\frac{x}{x_o}\right)^2 \frac{C}{C_o x} \omega^2 t \qquad (3)$$

Dans la formule (3), x = distance du la particule à l'axe du rotor,

$\left(\frac{x}{x_o}\right)^2$ = correction due à la dilution radiale du produit causée par la forme en secteur de la cellule,

C = variation de la concentration pour une variation x sur la courbe,

C_o = concentration initiale,

ω = vitesse angulaire

t = temps

La fonction g (S) a été calculée à partir de 2 ou 3 photos pour le rRNA. Lorsque les valeurs de S sont très faibles, le phénomène de diffusion devient suffisamment important pour perturber les résultats. Il est alors nécessaire de calculer g (S) à partir d'une dizaine de photographies et d'extrapoler à temps infini (BALDWIN, 1954). Cette méthode, indispensable dans le cas des tRNA, est extrêmement longue et nous ne l'avons que rarement utilisée.

D. CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SEPHADEX G100

Dans l'étude des tRNA, nous avons employé cette méthode d'analyse par filtration moléculaire. Le gel de dextrane SEPHADEX G100

(PHARMACIA, Uppsala) est équilibré avec NaCl 0, 05 M et élué avec une solution identique. La chromatographie est réalisée à 4°.

Il faut remarquer que, si les chaînes de tRNA étaient coupées en deux parties égales, nous ne l'observerions pas avec cette méthode. En effet, d'après ZACHAU (1965), seules les polynucléotides inférieurs ou égaux au décanucléotide sont élués à une position nettement différente des tRNA. Cependant, s'il y a des coupures multiples, l'apparition d'oligonucléotides devient alors nettement visible.

E. COURBES DE FUSION

La courbe de fusion d'un polynucléotide est représentée par la mesure de l'absorption UV en fonction de la température. En effet, les structures hélicoïdales sont détruites au cours du chauffage : ceci entraîne une augmentation de l'absorption UV, c'est-à-dire une hyperchromicité.

La détermination des courbes de fusion a été effectuée pour les tRNA qui présentent plusieurs zones en double hélice. La transition entre l'état structuré et l'état désorganisé est assez large car les divers tRNA spécifiques présentent des chaînes de compositions différentes. De plus, les tRNA possèdent une structure tertiaire qui influence la première partie de la courbe de fusion (LINDAHL, ADAMS et FRESCO, 1966).

Les mesures ont été effectuées dans un tampon Tris-HCl 0, 01 M (pH 7, 4) - NaCl 0, 01 M. Dans certains cas, Mg^{++} a été ajouté à une concentration de 0, 01 M ou de 0, 001 M. Nous avons utilisé un spectrophotomètre BECKMAN, modèle DU, ou un spectrophotomètre UNICAM SP 800, équipés d'un système de chauffage par circulation. Le contrôle de la température a été réalisé à l'aide d'un thermocouple plongeant dans la cuve de référence. La densité optique a été mesurée à 260 mμ. Vers la fin de nos travaux, nous avons pu effectuer des enregistrements avec

un enregistreur XY LUXYTRACE qui permet un tracé beaucoup plus précis de la courbe de fusion. Le tracé de la courbe de fusion permet la mesure de la température de demi-transition, ou Tm, et de l'hyperchromicité. Pour pouvoir comparer les courbes de fusion de différents échantillons, les diagrammes tracés représentent la fonction

$$\frac{\text{D.O.}_{t^\circ}}{\text{D.O.}_{20^\circ}} = f \text{ (température)} .$$

DEUXIEME PARTIE

ETUDE CHIMIQUE ET PHYSICOCHIMIQUE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES ALCOYLES

CHAPITRE III

METHYLATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

A. INTRODUCTION

Les études in vitro sur la méthylation des RNA et de leurs constituants sont nombreuses. Si ANDERSON et coll. (1952) utilisaient l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent, les principaux réactifs employés pour la méthylation sont le méthane sulfonate de méthyle, le diazométhane et le sulfate de méthyle. D'autres produits, cependant, sont des agents de méthylation : citons, par exemple, la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine récemment utilisée par SINGER et coll. (1968) sur le RNA du virus de la Mosaïque du tabac.

Le méthane sulfonate de méthyle a été employé, à pH 7, par LAWLEY et BROOKES (1963) sur le RNA et par LUDLUM (1966 a, b) et CHEN et DAVIS (1965) sur le poly A et le poly C.

L'action du diazométhane sur les bases, les nucléosides, les nucléotides et les dinucléosides-phosphates, a fait l'objet des travaux de BREDERECK (1947), HAINES, REESE et TODD (1962, 1964), BRIMACOMBE et coll. (1965), HOLY et SCHEIT (1966, 1967), GRIFFIN, HAINES et

REESE (1967). Ce réactif a également été utilisé pour la méthylation de polynucléotides de synthèse (poly A et poly C) (BRIMACOMBE et coll., 1965), ainsi que pour celle du RNA et du DNA (KRIEK et EMMELOT, 1963, 1964).

Le sulfate de méthyle a également été largement utilisé pour la méthylation des bases puriques et pyrimidiques et des nucléosides et nucléotides correspondants (BREDERECK, 1948 ; REINER et ZAMENHOF, 1957 ; WACKER et EBERT, 1959 ; BROOKES et LAWLEY, 1960, 1961 a, 1962 ; JONES et ROBINS, 1962, 1963). BRIMACOMBE et coll. (1965), SCHEIT et HOLY (1966, 1967), MICHELSON et POCHON (1966), POCHON et MICHELSON (1967) ont étudié la méthylation, par le sulfate de méthyle, de divers homopolymères et l'effet de cette alcoylation sur leurs propriétés physicochimiques. Par contre, peu de travaux ont eu trait à l'emploi de ce réactif pour la méthylation du RNA. FRAENKEL-CONRAT (1961), au cours d'une étude de l'effet de divers agents alcoylants sur le RNA du virus de la mosaïque du tabac, a constaté que le sulfate de méthyle, à pH 6 ou 9, permet d'alcoyler essentiellement les résidus guanine, inactivant rapidement le pouvoir infectieux du RNA et provoquant aussi l'apparition de mutants.

Tous ces réactifs conduisent à la méthylation des nucléosides puriques (la guanosine étant beaucoup plus réactive que l'adénosine), et d'une manière beaucoup moins importante à celle de la cytidine. Beaucoup d'auteurs considèrent même, en première approximation, que ces réactifs alcoylants sont des réactifs spécifiques des nucléosides puriques. Le seul qui fasse exception à cette règle est le diazométhane qui méthyle l'ensemble des nucléosides, y compris l'uridine qui est même attaqué de façon prédominante. Signalons cependant que l'emploi du sulfate de méthyle en présence de tributylamine permet également de modifier l'uridine (POCHON et MICHELSON, 1967).

L'étude de la nature des bases méthylées par ces réactifs a été facilitée par un certain nombre de travaux qui ont porté sur la synthèse chimique totale et sur l'étude de la structure et de propriétés des dérivés puriques et pyrimidiques N-méthylés (purines : ELION, 1957 ; PFLEIDERER, 1961 - pyrimidines : FOX et SHUGAR, 1952 ; SZER et SHUGAR, 1960).

La plupart des réactions de méthylation ont été effectuées en milieu aqueux. La méthylation en solvant organique (diméthylformamide, diméthylacétamide ou diméthylsulfoxyde) n'a été employée que pour l'étude de la méthylation des constituants des acides nucléiques (BROOKES et LAWLEY, 1960, 1962 ; JONES et ROBINS, 1963). Pour les RNA, à côté des solutions aqueuses, des mélanges ou des suspensions de solvant organique dans l'eau ont été utilisés : travaux de KRIEK et EMMELOT (1963) sur l'action d'une solution éthérée de diazométhane avec le RNA (anhydre ou en solution aqueuse). SINGER et coll. (1967, 1968) ont réalisé la méthylation du RNA du virus de la mosaïque du tabac avec la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine en solution aqueuse à 67 p. 100 de diméthylformamide.

Un grand nombre de travaux que nous venons de mentionner sont postérieurs au moment où nous avons commencé notre propre étude de la méthylation des acides ribonucléiques (1963) et sont même postérieurs à la publication du mémoire qui a trait à ces travaux (BOLLACK, KEITH et EBEL, 1965). Au début de ce travail, les seules données relativement précises concernaient la méthylation des constituants des acides nucléiques. Par contre, les travaux relatifs à la méthylation des RNA étaient très fragmentaires. L'effet de la méthylation sur l'intégrité moléculaire des RNA était à peine abordé.

On peut donc considérer qu'à cette époque notre travail présentait encore un caractère original et, ceci d'autant plus que nous avions

à notre disposition la méthode décrite par AUBEL-SADRON, BECK et EBEL (1961), permettant la solubilisation des acides nucléiques dans un solvant organique anhydre. Il nous a semblé que l'étude de la méthylation dans un tel milieu pouvait présenter un avantage sur la méthylation en milieu aqueux, plus particulièrement en diminuant les risques de coupure hydrolytique des liaisons internucléotidiques. Nous avons ainsi été amenés à effectuer une étude comparative de la méthylation en milieu organique et en milieu aqueux. L'agent de méthylation choisi a été le sulfate de méthyle.

B. METHYLATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES PAR LE SULFATE DE METHYLE EN MILIEU DIMETHYLFORMAMIDE

I. DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE

1) Solubilisation des acides nucléiques dans le diméthylformamide

A la suite des travaux de AUBEL-SADRON, BECK et EBEL (1961) relatifs à une méthode de solubilisation des acides nucléiques dans les solvants organiques, notre choix s'est porté sur le diméthylformamide (DMF). En effet, ces travaux ont montré que les RNA pouvaient être dissous, sous forme de ribonucléates d'ammonium quaternaire, dans de nombreux solvants organiques polaires et, notamment, dans le DMF (pour les tRNA, WEIL et EBEL, 1962). Après régénération de leurs sels de Na^+, ces acides nucléiques conservent leurs stuctures initiales et leurs propriétés biologiques (WEIL, EBEL et MONIER, 1961 ; EBEL et coll., 1965). De plus, le DMF est un solvant dipolaire aprotique qui est connu pour favoriser les réactions d'alcoylation (PARKER, 1962). Il possède un certain pouvoir tampon qui permet d'éviter le détachement du ribose (JONES et ROBINS, 1963).

Cette technique consiste à précipiter le RNA sous forme de sel d'ammonium quaternaire (triméthylhexadécylammonium). La présence, dans le cation, d'une longue chaîne aliphatique permet la solubilisation du précipité dans un solvant organique (diméthylformamide, alcools, etc...).

A un volume de solution de RNA, contenant environ 2 mg de RNA/ml, on ajoute un volume de solution de CETAVLON ou bromure de triméthylhexadécylammonium à 0,2 p. 100 (EASTMAN KODAK). Ces quantités correspondent sensiblement à un reste ammonium quaternaire par phosphate nucléotidique. Le ribonucléate précipite (si nécessaire, on peut rajouter un peu de solution d'ammonium quaternaire). Après centrifugation, le précipité est lavé deux fois à l'eau distillée. Une fois bien égoutté, il est dissous dans le DMF, en agitant à la main ou avec un agitateur mécanique ; il faut éviter d'utiliser une baguette de verre, car il se forme dans ces conditions une masse visqueuse insoluble. La concentration des solutions obtenues est de l'ordre de 2 mg de RNA/ml.

2) Réaction de méthylation

On ajoute, à des parties aliquotes de la solution ainsi préparée, des quantités déterminées du réactif alcoylant. Dans ce travail, nous avons employé le sulfate de méthyle (PROLABO) comme agent de méthylation. Les caractéristiques de ce réactif sont les suivantes :

Formule	$SO_2(OCH_3)_2$
M	126
d_4^{20}	1,332
E_{760}	188° 5

Après agitation, on laisse la solution dans des conditions bien définies de temps et de température qui seront étudiées dans ce chapitre. Si la quantité de réactif ajouté est élevée, un trouble, dû à la précipitation de l'acide nucléique, peut se produire plus ou moins rapidement, probablement provoqué par une acidification du milieu.

Nous avons exprimé les conditions quantitatives de la réaction à l'aide du rapport "m" :

$$m = \frac{\text{nombre de moles de réactif alcoylant dans le milieu}}{\text{nombre moyen de nucléotides dans le milieu}} = Me_2SO_4/P$$

3) Régénération du sel de sodium du RNA

La réaction terminée, on ajoute à la solution organique 1/10 à 1/5 de volume de NaCl 3 M. Les ions ammonium quaternaire sont déplacés par les ions Na^+ et le ribonucléate de sodium précipite. On laisse la précipitation se terminer à 4° durant 1 à 2 heures. Après centrifugation, le précipité est lavé deux fois avec le mélange froid éthanol - NaCl 0,1 M (2 : 1 v/v). Les solutions peuvent se conserver congelées à -20° s'il s'agit de sRNA (à une concentration supérieure à 1 mg/ml). Dans le cas du rRNA, il est nécessaire de précipiter l'acide nucléique par deux volumes d'éthanol froid (en présence de Na^+) avant de la conserver à -20°.

II. METHYLATION DES CONSTITUANTS DU RNA

Dans une étape préliminaire, nous avons étudié la méthylation par le sulfate de méthyle, en milieu diméthylformamide, des constituants du RNA. Cette étude a porté sur les nucléosides car les bases libres possèdent un azote supplémentaire susceptible de réagir avec les

réactifs alcoylants. Elle avait déjà été effectuée par BROOKES et LAWLEY (1960, 1962) et par JONES et ROBINS (1963). Nous l'avons cependant reprise dans le but de vérifier l'efficacité de nos conditions expérimentales et de posséder les produits de référence pour les études chromatographiques et spectrales.

1) Analyse des dérivés obtenus

Les nucléosides méthylés ont été identifiés par leurs Rf dans différents solvants chromatographiques et par les caractéristiques de leurs spectres d'absorption UV en milieu acide ou alcalin. Il en a été de même des bases obtenues par l'hydrolyse des nucléosides méthylés pendant 1 heure à 100°, soit par $HClO_4$ 12 N dans les conditions décrites dans le chapitre I, soit, dans le cas des nucléosides puriques, par HCl N.

L'adénosine conduit d'une manière prépondérante à la 1-méthyladénosine avec un peu de 3-méthyladénosine et la guanosine à plusieurs dérivés dont le plus important est la 7-méthylguanosine. La cytidine est transformée en 3-méthylcytidine*. Par contre, l'uridine en solution dans le DMF ne réagit pas avec le sulfate de méthyle.

En ce qui concerne la méthylation de certaines bases mineures présentes dans les tRNA, dans le cas de la thymine et de la pseudouridine, nous n'avons observé aucun nouveau dérivé absorbant dans l'UV. Ce résultat n'est pas étonnant si l'on considère que le sulfate de méthyle ne réagit pas avec l'uracile ou avec l'uridine. L'inosine, au contraire, peut réagir avec le sulfate de méthyle et conduire à des dérivés substitués en position 1 ou 7 (JONES et ROBINS, 1963).

---

* Nous avons employé, pour les bases pyrimidiques, la nomenclature adoptée par l'Union Internationale de Biochimie.

Tableau I

CARACTERISTIQUES SPECTRALES DES BASES PURIQUES ET PYRIMIDIQUES ET DE LEURS PRINCIPAUX DERIVES METHYLES

Composé	pH	λmax mμ	λmin mμ	Inflexion	$\frac{A_{250}}{A_{260}}$	$\frac{A_{280}}{A_{260}}$	$\varepsilon max \cdot 10^{-3}$
Guanine	1	248	222	270	1,37	0,84	11,4
	12	246	273	255	0,98	1,13	8,0
7-Méthyl-guanine	1	250	228	270		0,79	10,6
	7	282, 247	260, 236			1,8	7,4
	13	280	257	237		1,9	7,3
2-4-diamino-6-OH, 5 N-méthylformamidopyrimidine	1	262	221				13
	7	264	242	233			14
	13	261	243				10
Adénine	2	262,5	229		0,76	0,37	13,1
	12	269	237		0,57	0,60	12,3
1-Méthyl-adénine	4	259	228			0,23	11,7
	13	270	239			0,85	14,4
3-Méthyl-adénine	3	274	235			1,26	15,9
	13	273	244			1,48	12,8
Cytosine	2	210, 274	238		0,48	1,53	10,2
	10	267	247		0,78	0,58	6,13
3-Méthyl-cytosine	4	274	240			1,33	9,4
	12	294	250			5,7	11,9
Uracile	2	259	227		0,84	0,17	8,2
	12	284	241		0,71	1,40	6,15

Dans les tableaux I et II, nous avons réuni les principales caractéristiques spectrales et chromatographiques des bases principales obtenues après hydrolyse chlorhydrique ou perchlorique des nucléosides méthylés, ainsi que du produit de décomposition alcaline de la 7-méthyl-guanosine.

Tableau II

CARACTERISTIQUES CHROMATOGRAPHIQUES DES BASES PURIQUES ET PYRIMIDIQUES ET DE LEURS DERIVES METHYLES

Bases	Rf solvant I	$\frac{Rf}{Rf(adénine)} = R_{Ad}$ solvant II
Guanine	0,23	0,22
Adénine	0,34	1,00
Cytosine	0,45	0,53
Uracile	0,66	0,69
7-Méthylguanine	0,31	0,40
1-Méthyladénine	0,34	0,61
3-Méthyladénine	0,57	0,95
3-Méthylcytosine	0,53	1,10

2) Stabilité des produits de méthylation

Les bases méthylées sont stables en milieu acide(HCl N, 1 heure à 100°). Par contre, leur comportement en milieu alcalin est différent.

- La 1-méthyladénine (ainsi que le ribonucléoside correspondant), traitée 18 heures à 100° en solution dans NaOH 0,1 N, donne la 6-méthylaminopurine (BROOKES et LAWLEY, 1960).

- Chauffée en milieu alcalin, la 3-méthylcytosine (ainsi que le ribonucléoside correspondant) subit une désamination en 3-méthyluracile (BROOKES et LAWLEY, 1962).

- Si la 7-méthylguanine est stable en milieu alcalin, il n'en est pas de même pour la 7-méthylguanosine (BROOKES et LAWLEY, 1961). Comme dans tous les dérivés 7,9-disubstitués de la guanine, le cycle imidazole s'ouvre en milieu alcalin (KOH 0,1 N, température ambiante) (HAINES, REESE et TODD, 1962).

Le schéma 1 représente les dérivés obtenus en milieu acide ou alcalin dans les réactions précédentes. Les composés (a) et (b) dérivant de la 7-méthylguanosine en milieu alcalin absorbent également dans l'UV (cf. tableau I).

Ces diverses modifications en milieu alcalin sont intéressantes pour caractériser les produits de méthylation. Toutefois, elles nous ont amenés à choisir des hydrolyses de type acide au cours de l'étude des RNA, nous permettant ainsi d'écarter plus aisément des interprétations erronées.

3) Recherche de la méthylation du ribose

Cette étude a été effectuée par révélation des chromatogrammes de nucléosides méthylés selon la technique suivante.

On prépare les solutions (a) et (b) :

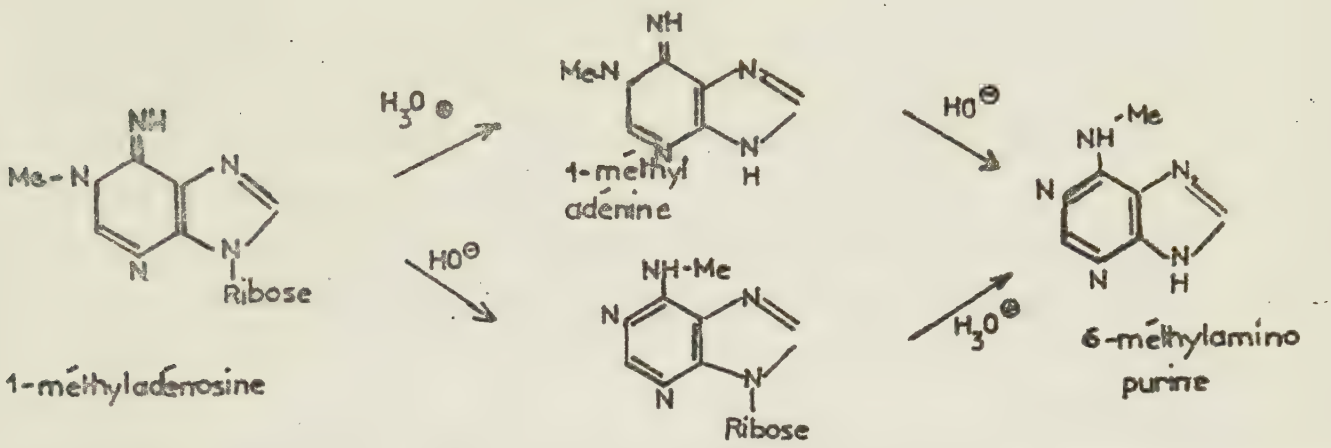
(a) solution aqueuse de métaperiodate de sodium à 0,1 p. 100

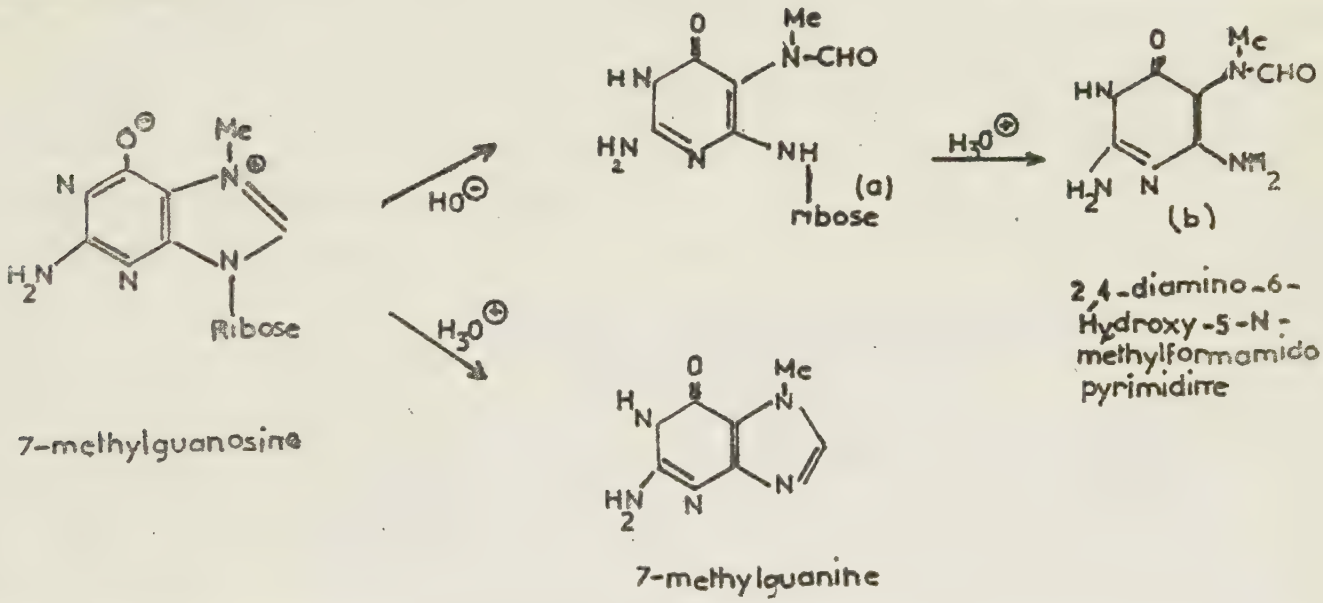
(b) solution de 2,8 g de benzidine dans 80 ml d'éthanol à 96 p. 100, additionnée de 70 ml d'eau, 30 ml d'acétone et 1,5 ml HCl N.

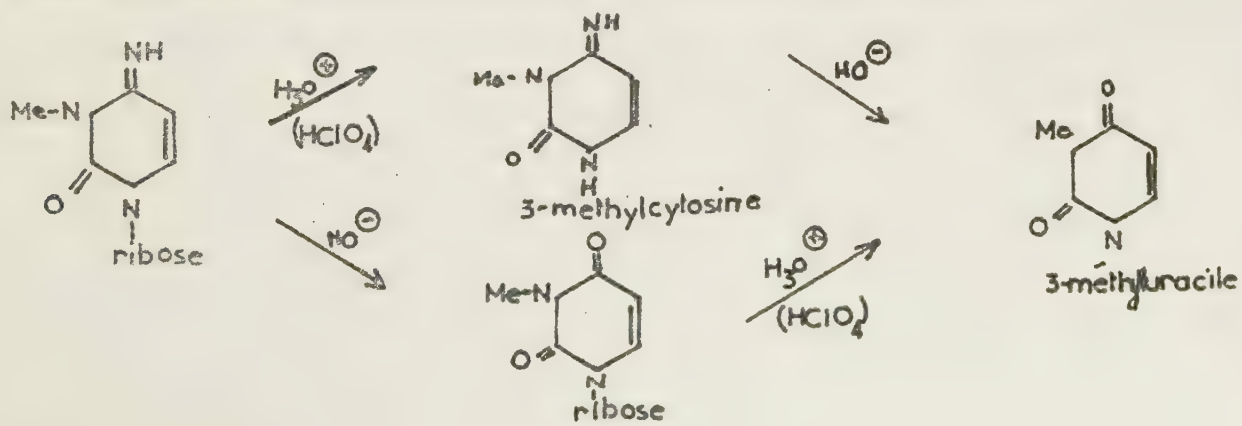
Après pulvérisation du chromatogramme avec la solution (a), on laisse

Schéma 1

TRANSFORMATIONS DES NUCLEOSIDES METHYLES
EN MILIEU ACIDE OU ALCALIN







partiellement sécher ; sur le papier encore humide, on pulvérise la solution (b) fraîchement préparée. Le ribose se révèle en tache blanche sur un fond bleu, cette coloration provenant de la réaction du periodate avec la benzidine. Cette révélation n'a lieu que si les -OH en 2' et 3' du ribose sont libres, de manière à permettre la réaction avec le periodate. La méthylation d'un -OH en 2' ou 3' empêche cette réaction.

La méthylation des nucléosides n'a pas empêché la révélation du ribose par la méthode précédente. On peut en conclure que le ribose n'est pas méthylé dans les conditions utilisées.

Conclusion

Les résultats obtenus sur les ribonucléosides libres faciliteront l'orientation des recherches [illegible] la méthylation des RNA. Nous pouvons, d'ores et déjà, supposer que, dans la mesure où les bases de la chaîne polynucléotidique réagiront comme elles réagissent lorsqu'elles sont simplement liées au ribose, nous obtiendrons probablement la 7-méthylguanine, la 1-méthyladénine et la 3-méthylcytosine, et que le -OH en 2' du ribose ne sera pas méthylé.

La stabilité des dérivés méthylés des bases en milieu acide nous permettra d'utiliser l'hydrolyse perchlorique pour l'analyse des produits de méthylation des RNA. Par contre, les réactions secondaires observées dans l'hydrolyse alcaline nous amènent à écarter ce type d'hydrolyse.

Par ailleurs, la connaissance des spectres UV et des Rf chromatographiques des bases méthylées nous permet l'identification des produits de réaction.

III. METHYLATION DES RNA

Ce travail a été effectué sur les acides ribonucléiques de levure de boulangerie.

1) Etude chimique

a - Nature des dérivés obtenus après hydrolyse des RNA

Les RNA traités par le sulfate de méthyle pendant 22 heures à 4° ont été hydrolysés par $HClO_4$ et chromatographiés comme décrit dans la chapitre I. La figure 2 représente le chromatogramme obtenu à partir d'un RNA méthylé.

Les dérivés méthylés suivants ont pu être mis en évidence : 7-méthylguanine, 1-méthyladénine et 3-méthylcytosine. Ces résultats sont en accord avec ceux observés au cours de la méthylation des nucléosides.

b - Expression des résultats

La quantité de base présente dans les différentes taches repérées sur le chromatogramme a été calculée à partir du spectre d'absorption UV. L'uracile ne réagissant pas, nous avons calculé pour chaque base le rapport

$$\frac{\text{moles de base intacte + moles de base modifiée}}{\text{moles d'uracile}}$$

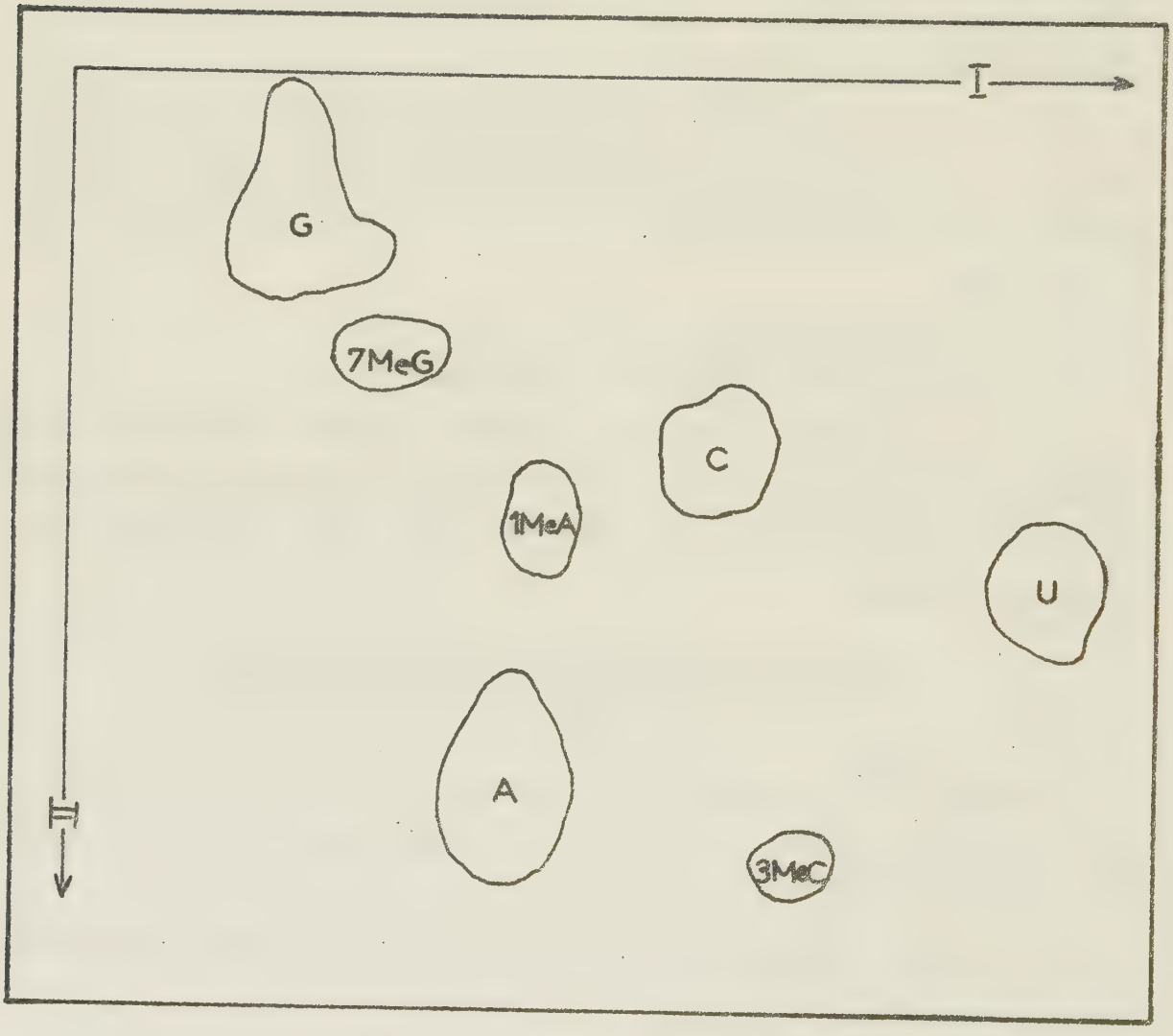
Ces rapports restent constants au cours de la méthylation pour un même type de RNA. Il en résulte qu'il n'y a pas eu de disparition de matériel nucléotidique pendant la réaction.

Pour chaque base, le taux de méthylation a été exprimé par le rapport

$$\frac{\text{base méthylée}}{\text{base intacte + base méthylée}} \times 100$$

Figure 2

CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE DES BASES NORMALES ET METHYLEES



Solvant I : isopropanol - HCL - H_2O (170 : 41 : qsp 250 v/v)

Solvant II : n-butanol - NH_4OH 6N (180 : 30 v/v)

c - Influence de la durée de réaction

L'influence du temps de contact du RNA avec une quantité constante de sulfate de méthyle dans le DMF est indiquée dans le tableau III. On remarque que la réaction de méthylation se déroule d'une manière progressive.

Tableau III

INFLUENCE DE LA DUREE DE REACTION SUR LA METHYLATION DU RNA DANS LE DMF

Durée de la réaction	$\frac{7\text{-MeG}}{7\text{-MeG} + G} \times 100$	$\frac{1\text{-MeA}}{1\text{-MeA} + A} \times 100$	$\frac{3\text{-MeC}}{3\text{-MeC} + C} \times 100$
3 heures	9	2	traces *
6 "	13	3	traces
22 "	18	5	traces

Conditions expérimentales : rRNA traité par 4 Me_2SO_4/nucléotide du RNA dans le milieu réactionnel - température = 4°.

* Le terme de traces est employé lorsque les quantités de produit ne permettent pas un dosage significatif.

d - Influence de la quantité de sulfate de méthyle

Des quantités croissantes de sulfate de méthyle ont été ajoutées à des aliquotes de solutions de RNA ou de tRNA dans le DMF. Les résultats obtenus avec les deux types de RNA sont comparables. Sur la figure 3, nous avons représenté pour chaque rapport Me_2SO_4/P la moyenne de plusieurs expériences (jusqu'à 8 pour certaines valeurs).

Cette expression nous a paru plus parlante que l'indication de la concentration de sulfate de méthyle dans le milieu. Les taux de dilution des RNA étaient, dans toutes les expériences, voisins de 2 mg/ml.

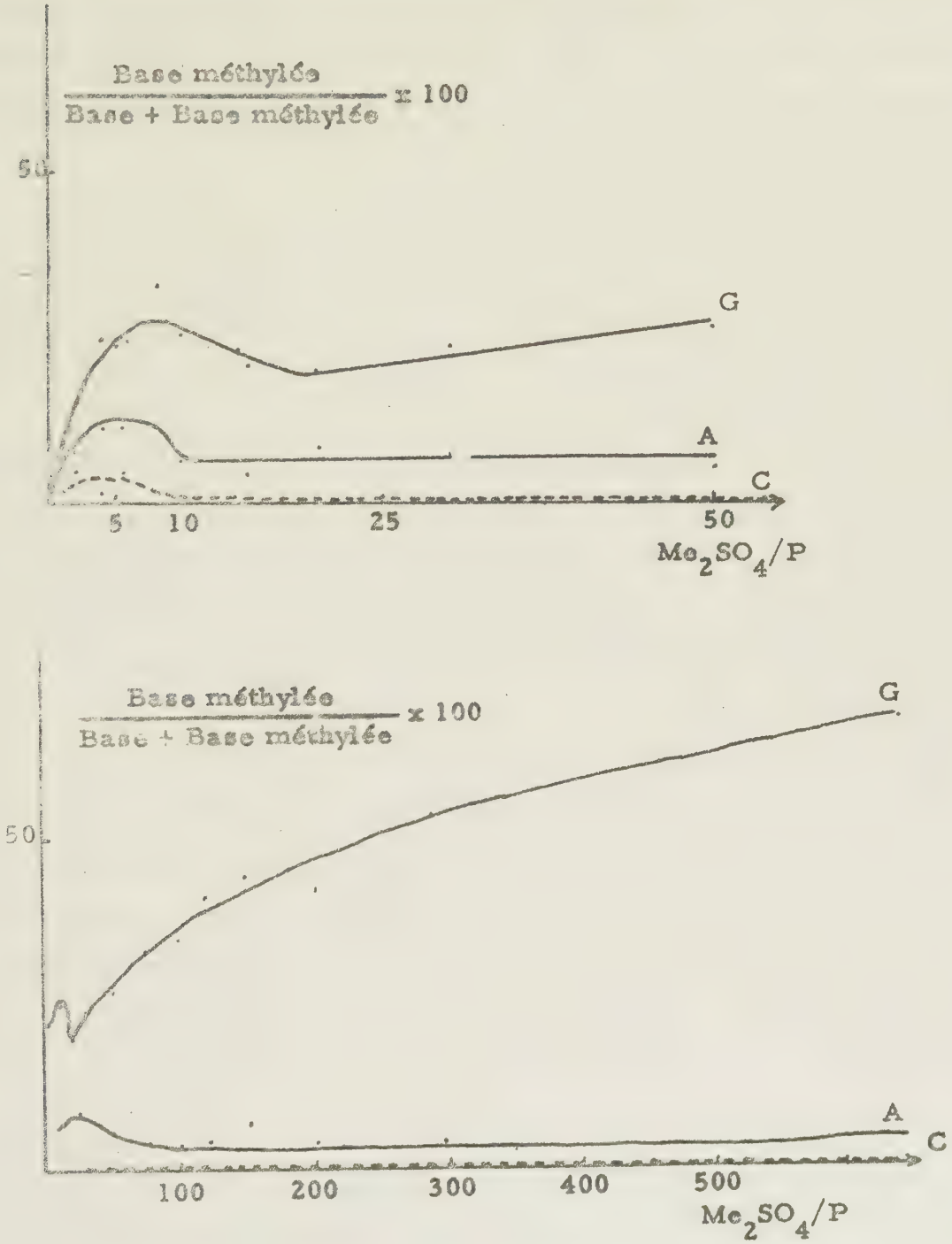
On peut observer, au début de la courbe, une augmentation rapide du taux de 7-méthylguanine, qui atteint un maximum de 25 p. 100 (pour 5 à 10 Me_2SO_4/P), puis a tendance à s'abaisser un peu. Lorsque les quantités de réactif deviennent beaucoup plus élevées, on obtient jusqu'à 70 p. 100 de résidus guanine méthylés. Par contre, dans le cas de l'adénine, on observe un peu de 1-méthyladénine (environ 8 à 12 p. 100) pour les rapports Me_2SO_4/P inférieurs à 8, puis rapidement le taux de 1-méthyladénine décroît et reste à un palier de l'ordre de 5 p. 100. Les variations de méthylation de la cytosine sont comparables à celles de l'adénine : les taux de méthylation atteignent généralement 6 à 8 p. 100 au maximum pour des valeurs de Me_2SO_4/P inférieures à 5, puis ils diminuent et seules des traces sont parfois décelées.

On constate donc pour les trois bases, jusqu'à des rapports Me_2SO_4/P inférieurs à 5, une augmentation du taux de méthylation suivie ensuite d'une diminution pour des rapports plus élevés. Cette diminution peut s'expliquer par la précipitation du RNA qui se produit à partir d'une certaine concentration de sulfate de méthyle dans le milieu et qui pourrait être due à l'acidité libérée au cours de la réaction. Il apparaît donc que cette précipitation perturbe le phénomène de méthylation, particulièrement pour l'adénine et pour la cytosine.

Nous avons essayé d'éviter cette précipitation en effectuant la réaction en présence d'une base organique neutralisant l'acidité libérée. Mais la méthylation en présence de pyridine n'a pas empêché la formation d'un précipité.

Figure 3

INFLUENCE DE LA QUANTITE DE SULFATE DE METHYLE PAR NUCLEOTIDE DANS LE MILIEU REACTIONNEL SUR LA METHYLATION DU RNA DANS LE DIMETHYLFORMAMIDE



Conditions expérimentales de la méthylation : 22 heures à 4°

2) Etude physicochimique

a - Spectres d'absorption UV des RNA méthylés

Le tableau IV résume les caractéristiques des spectres des RNA selon le taux de méthylation exprimé en pourcentage de guanine méthylée. Nous pouvons constater que ces spectres sont pratiquement identiques à ceux des RNA témoins.

b - Coefficient d'absorption molaire $\varepsilon(P)$

Le tableau V représente les valeurs de $\varepsilon(P)$ déterminées pour des rRNA méthylés dans le DMF. Ces résultats montrent que $\varepsilon(P)$ est à peu près constant.

La similitude des spectres et des coefficients d'absorption molaire des RNA natifs ou méthylés nous a permis d'adopter dans les deux cas la même correspondance entre la densité optique et la concentration en RNA. Les dosages ont ainsi montré que le taux de RNA régénéré après passage dans le DMF, suivi ou non de méthylation, est de l'ordre de 80 p. 100.

c - Intégrité de la structure des rRNA

Cette étude a été effectuée sur des rRNA préparés et conservés avec les précautions indiquées dans le chapitre I (en particulier en présence de PVS) pour minimiser, dans les préparations de RNA, l'existence de coupures dues à l'action des endonucléases et éventuellement masquées par la structure secondaire (BECK et coll., 1966).

- Centrifugation en gradient de saccharose. Nous avons étudié l'évolution des diagrammes obtenus après centrifugation des rRNA dans un gradient linéaire de concentration de saccharose (cf. chapitre II). La figure 4 représente les principales étapes que nous avons pu observer.

Tableau IV

CARACTERISTIQUES SPECTRALES DE RNA METHYLES DANS LE DMF

Echantillon	Me_2SO_4/P dans le milieu	Conditions de la réaction	7-MeG / G+7-MeG p. 100	λmax mμ	λmin mμ	$\frac{A_{250}}{A_{260}}$	$\frac{A_{280}}{A_{260}}$
rRNA natif	-	-	-	258	232	0,913	0,484
- après passage dans le DMF	0	22 h à 4°	-	258	232	0,890	0,494
- après méthylation dans le DMF	0,5	22 h à 4°	10	258	232	0,880	0,490
	3	22 h à 4°	16	258	232	0,900	0,488
	10	22 h à 4°	14	258	232	0,884	0,490

Les spectres ont été effectués dans NaCl 0,1 M.

Tableau V

COEFFICIENTS D'EXTINCTION MOLAIRE DES RNA METHYLES DANS LE DMF

Echantillon	Me_2SO_4/P dans le milieu	ε(P)
A	0	7670
B	30	8160
C	60	7920
D	100	8180
E	150	7760

Conditions expérimentales de la méthylation : 22 h à 4°.

Figure 4

DIAGRAMMES DE SEDIMENTATION EN GRADIENT DE SACCHAROSE DE rRNA METHYLES DANS LE DIMETHYLFORMAMIDE

Conditions expérimentales : 22 heures à 4°

Pourcentage de résidus guanine méthylés :

1 : 0 (témoin), 2 : 15 p. 100 , 3 : 33 p. 100 , 4 : 40 p. 100

Le RNA témoin, mis en solution dans le DMF et régénéré, présente deux pics qui sédimentent aux environs de concentrations en saccharose de 18 et 15 p. 100, le pic le plus lourd étant le plus important. Les déterminations réalisées par BECK et coll. (1966) conduisent à des valeurs de constantes de sédimentation de 25 et 15 S. Très rapidement, avec l'augmentation du degré de méthylation, le premier pic diminue tandis que le second s'accroît jusqu'à devenir un simple épaulement de ce dernier. D'autre part, la polydispersité devient plus importante.

- Ultracentrifugation analytique. Pour vérifier et préciser les phénomènes observés au cours des centrifugations en gradient de saccharose, nous avons étudié le comportement en ultracentrifugation analytique du RNA ribosomal traité par le sulfate de méthyle dans le DMF.

La distribution des constantes de sédimentation du rRNA a été calculée d'après les photos prises avec le dispositif UV. Nous avons également déterminé les valeurs de S par la méthode de SCHLIEREN. Les constantes de sédimentation ainsi calculées peuvent être comparées entre-elles, car nous avons utilisé des solutions de même concentration, mais elles ne coïncident pas avec celles qui sont obtenues par la méthode UV.

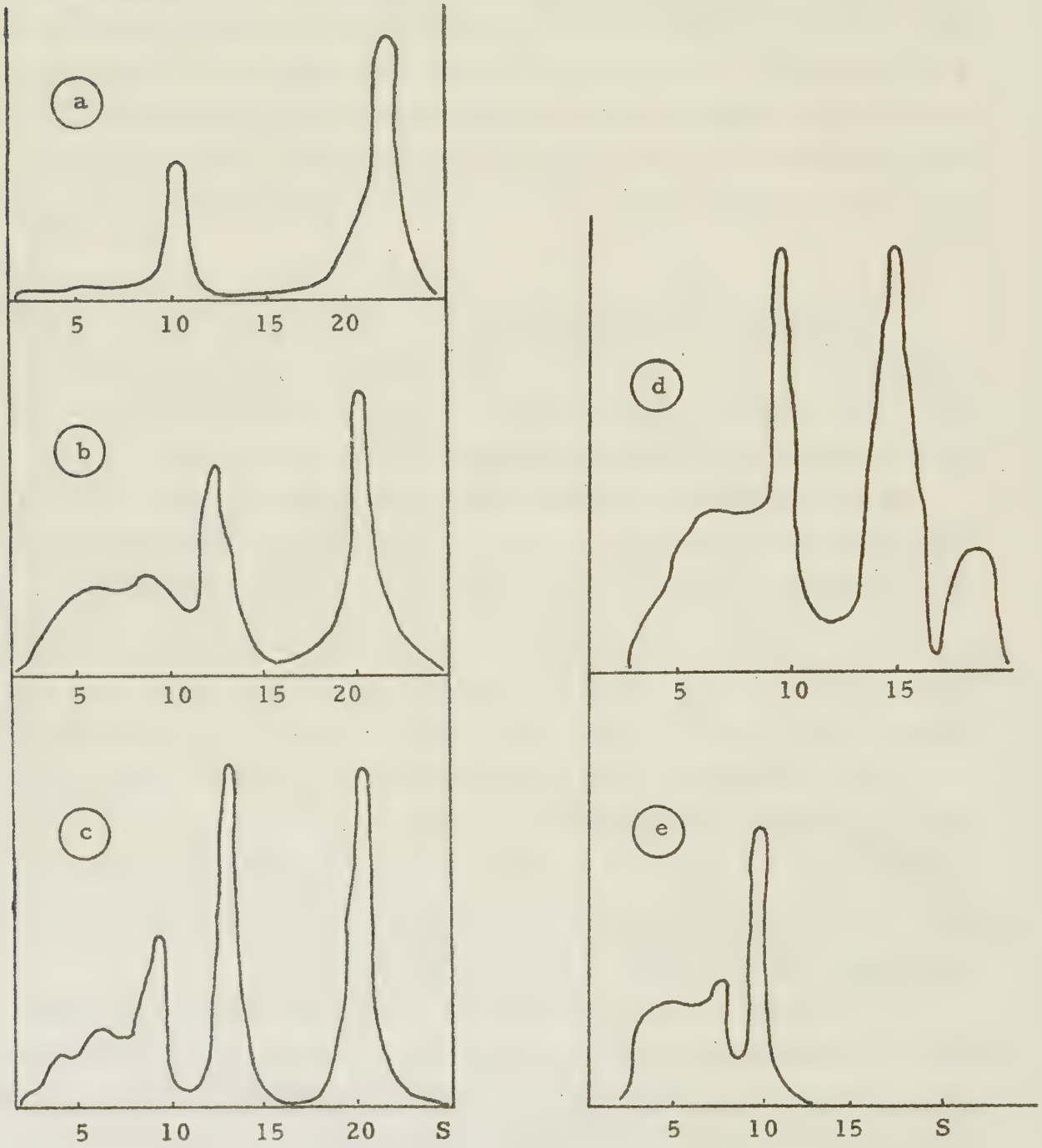
Dans le tableau VI, nous avons regroupé les résultats obtenus par les deux méthodes sur une série de rRNA.

La figure 4 représente la distribution des coefficients de sédimentation. Les mêmes rRNA étudiés par ultracentrifugation en gradient de saccharose avaient conduit à des résultats parallèles.

On remarque que le traitement par le sel d'ammonium quaternaire suivi du passage en solution organique avant régénération du rRNA provoque un léger abaissement de la valeur des constantes de sédimentation et surtout l'apparition d'un groupe de petits fragments très polydisperses.

Figure 5

DISTRIBUTION DES COEFFICIENTS DE SEDIMENTATION
DE rRNA METHYLES DANS LE DIMETHYLFORMAMIDE



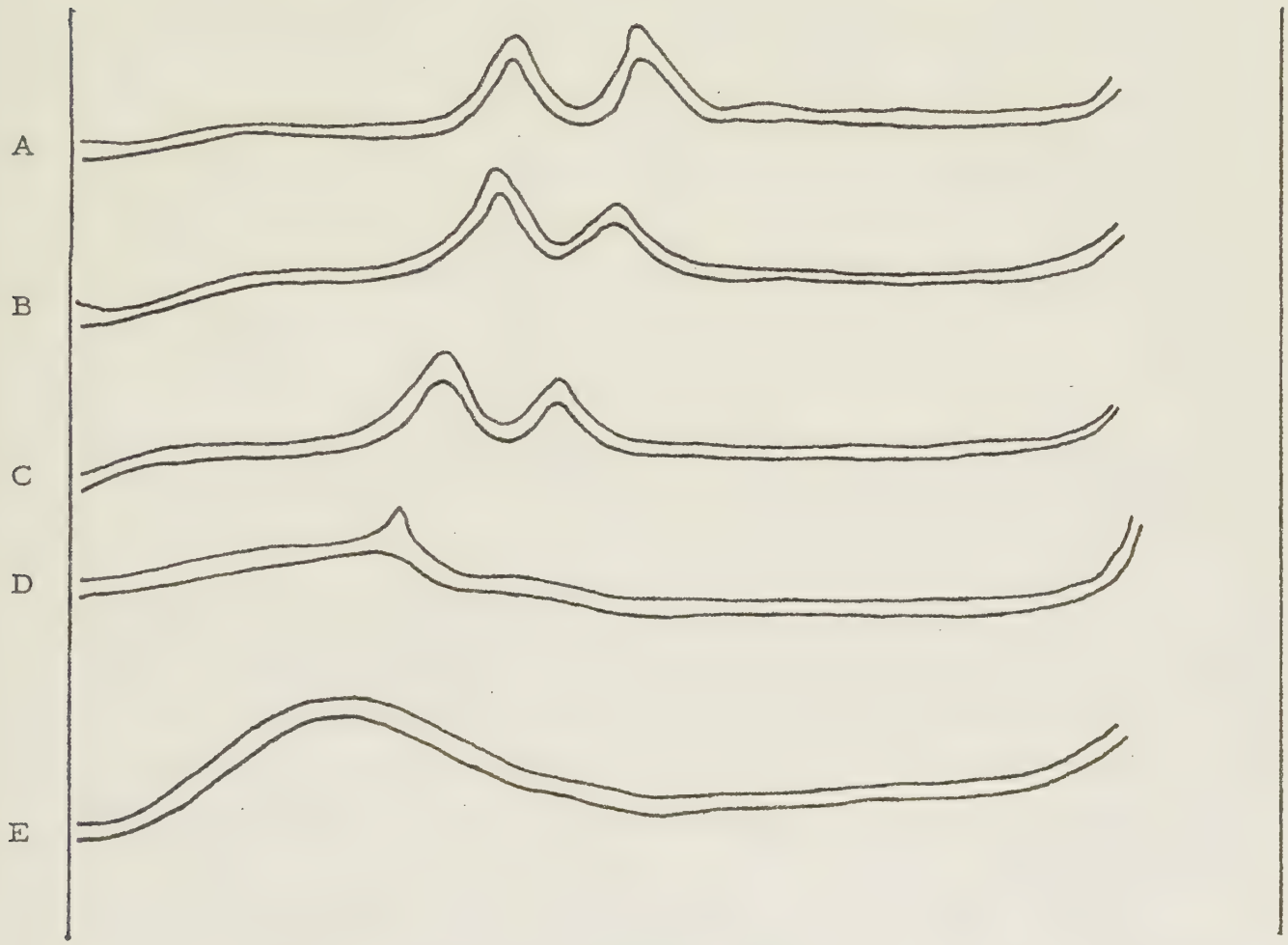
Centrifugation à 50 740 tours/min.

Conditions expérimentales de méthylation : 22 heures à 4°.

a : rRNA natif b : rRNA après passage dans le DMF
c : 0,5 Me_2SO_4/P d : 3 Me_2SO_4/P e : 10 Me_2SO_4/P

Figure 6

DIAGRAMMES DE SEDIMENTATION DE rRNA EN FONCTION DE L'INTENSITE DE LA METHYLATION DANS LE DIMETHYLFORMAMIDE



Conditions expérimentales de méthylation : 22 heures à 4°

A : témoin, B : 0,5 Me_2SO_4/P, C : 1 Me_2SO_4/P

D : 3 Me_2SO_4/P, E : 10 Me_2SO_4/P

Photos prises après 30 minutes de centrifugation à 50 740 tours/min.

Tableau VI

VARIATION DES COEFFICIENTS DE SEDIMENTATION DU RNA EN FONCTION DE L'INTENSITE DE LA METHYLATION EN MILIEU DIMETHYLFORMAMIDE

Me_2SO_4 par nucléotide	Constantes de sédimentation				
	Pic I		Pic II		Pic III
	UV	Schlieren	UV	Schlieren	UV
0 -RNA natif	22,5		11,8		
0 -RNA après passage DMF	20	17,4	12	13,7	
0,5	21,1	17,0	13	13,2	
3	15	15,7	9,5	12,5	5 à 8
10			9,5	7,7	4 à 8

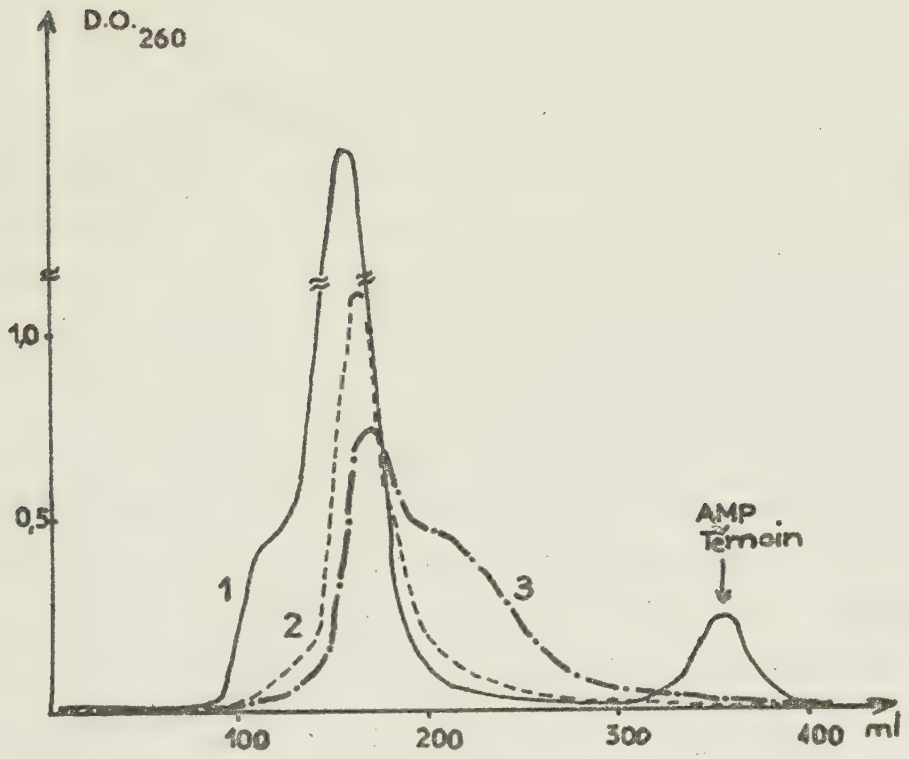
Conditions de méthylation : 22 h à 4°.

Au cours de la méthylation, il se produit une diminution progressive des valeurs moyennes des constantes de sédimentation des deux pics initiaux, avec apparition simultanée d'un massif assez polydisperse aux environs de 5-6 S. Lorsque la modification est assez intense, le premier pic disparaît complètement tandis que le deuxième pic présente une valeur moyenne de 10 S.

La figure 6 représente les images obtenues par la méthode de SCHLIEREN avec plusieurs RNA méthylés. Les photos reproduites ont été prises après 30 minutes de centrifugation. Là encore, nous remarquons que le pic lourd s'abaisse progressivement et que sa constante de sédimentation diminue, tandis qu'apparaît un massif de constituants plus légers se confondant peu à peu avec le deuxième pic.

Figure 7

ANALYSE SUR COLONNE DE SEPHADEX G 100
DE tRNA METHYLE DANS LE DIMETHYLFORMAMIDE



Conditions expérimentales :

Méthylation de 22 heures à 4°,
Colonne de 50 x 2,8 cm ; élution par NaCl 0,05 M ;
fractions de 10 ml

Pourcentage de résidus guanine méthylés :
1 : témoin 2 : 47 p. 100 3 : 67 p. 100

Conclusion

Les trois méthodes d'ultracentrifugation conduisent donc à des résultats comparables. En milieu DMF, la méthylation du rRNA par le sulfate de méthyle entraîne une coupure de la chaîne polynucléotidique avec apparition de petits fragments sédimentant vers 5-6S et d'une polydispersité qui accompagne la diminution des valeurs des constantes de sédimentation.

d - Intégrité de la structure des tRNA

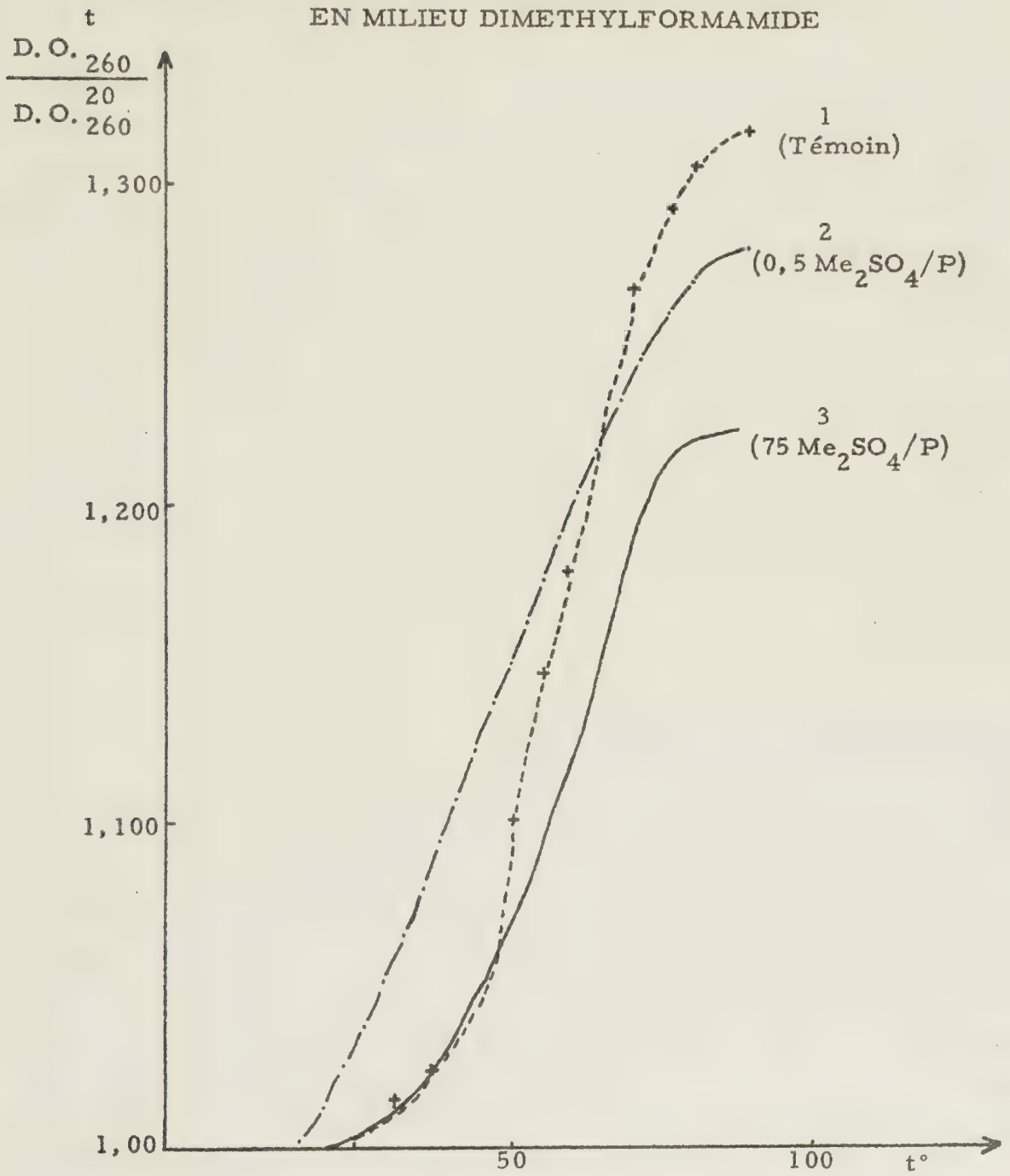
- Structure primaire. L'apparition d'oligonucléotides susceptibles de se former au cours de la méthylation des tRNA a été recherchée par chromatographie sur Sephadex G 100 (cf. chapitre I). La figure 7 représente les courbes obtenues avec un tRNA témoin (auquel nous avons ajouté de l'AMP) et deux tRNA méthylés.

L'épaulement qui peut être observé au début du pic (et qui est probablement dû à la présence d'un peu de RNA 5S à côté du tRNA) disparaît rapidement avec la méthylation. La position du pic principal reste par contre inchangée. Mais, si le degré de méthylation augmente, on note une apparition progressive d'oligonucléotides polydisperses qui se traduit par un épaulement prononcé, à droite du pic. Cette dégradation n'apparaît cependant que pour des taux de méthylation beaucoup plus élevés que dans le cas du rRNA. Pour un taux de guanine méthylée de 40 p. 100, le profil du tRNA est encore intact, alors que dans le cas du rRNA on observe déjà une dégradation profonde.

- Structure secondaire. La méthylation des tRNA conduit à une altération de la courbe de fusion (figure 8). Ce phénomène apparaît avec des taux de 7-méthylguanine nettement inférieurs à ceux qui provoquent l'apparition de ruptures dans la chaîne des tRNA (plus de 40 p. 100 de résidus guanine méthylés), et il est donc indépendant de celles-ci.

Figure 8

COURBES DE FUSION DE tRNA METHYLES
EN MILIEU DIMETHYLFORMAMIDE



Pourcentage de résidus guanine méthylés :
1 : témoin 2 : 8 p. 100 3 : 17 p. 100

C. METHYLATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES PAR LE SULFATE DE METHYLE EN SOLUTION AQUEUSE

L'étude de l'action du sulfate de méthyle sur le RNA, en milieu aqueux, a été conduite de façon sensiblement parallèle à l'étude en milieu organique. Dans la littérature, on relève essentiellement des méthylations en solution aqueuse à un pH voisin de 7 : sulfate de méthyle dans un tampon phosphate 0,002 à 0,005 M , pH 6 ou 9 (FRAENKEL-CONRAT, 1961), méthane sulfonate de méthyle en milieu acétate de potassium 0,4 M, pH initial 7,2 (BROOKES et LAWLEY, 1961 b) ou dans un tampon phosphate 0,01 M , pH 7,2 (LAWLEY et BROOKES, 1963), utilisation d'un titrateur automatique avec le sulfate de méthyle (BRIMACOMBE et coll., 1965), sulfate de méthyle en présence de tributylamine (MICHELSON et POCHON, 1966). Nous avons adopté des conditions voisines de celles décrites par BROOKES et LAWLEY (1961 b), mais en remplaçant le méthane sulfonate de méthyle par le sulfate de méthyle.

I. DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE

Le RNA est dissous dans une solution aqueuse d'acétate de potassium 0,4 M, à raison de 2 mg/ml environ. Cette solution est traitée par le sulfate de méthyle dans les conditions de temps et de température décrites plus loin (dans les conditions normales : à 4° pendant 22 heures). Après incubation, la régénération du sel de potassium est effectuée par addition de 2 volumes d'éthanol froid contenant 2 p. 100 d'acétate de potassium. Le précipité est lavé et récupéré comme dans le cas de la méthylation en milieu diméthylformamide

II. ETUDE CHIMIQUE

1) Nature des dérivés obtenus

L'analyse des bases des RNA a été effectuée selon la technique décrite au chapitre II. A côté des bases non modifiées, nous avons observé la présence des mêmes bases méthylées que lors de la méthylation en milieu DMF. Ces bases ont été identifiées par leurs caractéristiques spectrales et chromatographiques. Ce sont les 7-méthylguanine, 1-méthyladénine et 3-méthylcytosine. Dans quelques rares cas, nous avons pu constater, en outre, la présence de 3-méthyladénine.

Il faut relever que le système de solvants chromatographiques utilisé permet la séparation de la 3-méthyladénine et de la 3-méthylcytosine qui présentent des Rf identiques dans de nombreux solvants.

Les bilans de bases établis sur les RNA méthylés n'ont montré aucune disparition de matériel nucléique.

2) Influence de la durée de la réaction

Le tableau VII représente la variation du pourcentage de résidus guanine méthylés en fonction de la durée de méthylation, dans le cas d'un tRNA. Cette cinétique a été réalisée à 4°. On constate que la méthylation n'est pas immédiate et l'on pourra donc jouer sur le facteur "temps" pour obtenir un certain taux de réaction.

3) Influence de la température

Les tRNA, moins sensibles à l'action de la température que les rRNA, ont été soumis à des méthylations à 20 et 56°. Il est normal de constater (tableau VIII) qu'une élévation de la température permet d'accélérer la réaction.

Tableau VII

INFLUENCE DE LA DUREE DE REACTION SUR LE TAUX DE METHYLATION DE LA GUANINE

Durée de la réaction	$\frac{7\text{-MeG}}{7\text{-MeG} + G} \times 100$
10 minutes	1
20 minutes	5
30 minutes	7
1 heure	8
2 heures	10
4 heures	27
22 heures	28

Conditions expérimentales : tRNA ; 6 moles Me_2SO_4/P ; température : 4°.

Tableau VIII

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LA METHYLATION DU tRNA EN MILIEU AQUEUX

Me_2SO_4/P	Température	$\frac{7\text{-MeG}}{7\text{-MeG}+G}$ 100	$\frac{1\text{-MeA}}{1\text{-MeA}+A} \times 100$	$\frac{3\text{-MeC}}{3\text{-MeC}+C} \times 100$
10	20°	27	15	traces
	56°	35	19	traces
30	20°	65	37	10
	56°	78	41	22

Durée de la réaction : 3 heures.

4) Influence de la quantité de sulfate de méthyle par nucléotide dans le milieu réactionnel

A des aliquotes de solution de RNA dans l'acétate de potassium 0,4 M, nous avons ajouté des quantités variables de sulfate de méthyle. Après une incubation de 22 heures à 4°, les RNA ont été précipités et analysés. La figure 9 représente les pourcentages de méthylation des trois bases modifiées en fonction du rapport Me_2SO_4/nucléotide dans le milieu réactionnel.

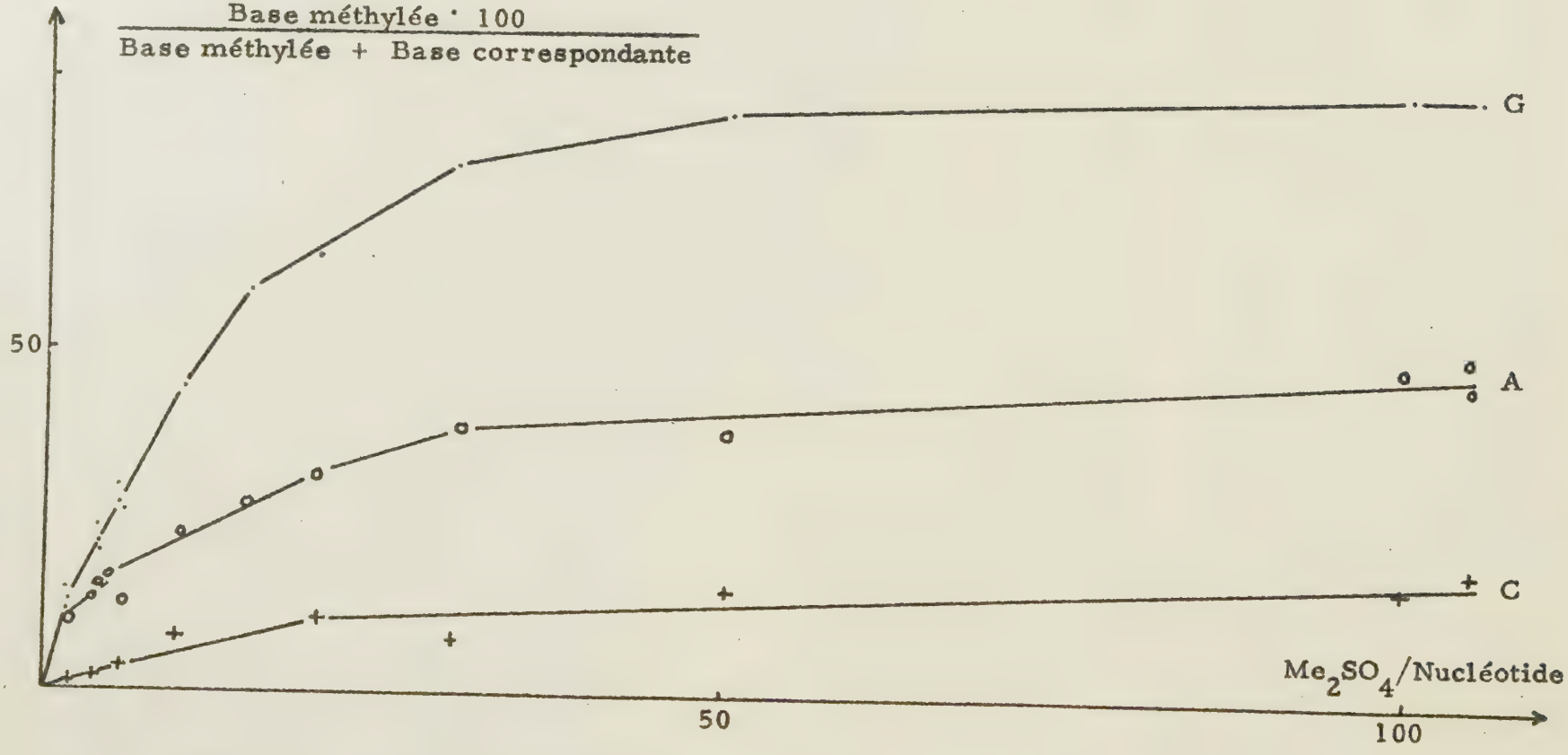
Les résultats obtenus avec le rRNA et le tRNA sont comparables. Pour un fort excès de sulfate de méthyle, on peut atteindre des taux de méthylation de 90 à 95 p. 100 pour la guanine, 50 p. 100 pour l'adénine et 10 à 15 p. 100 pour la cytosine.

Ces pourcentages élevés de méthylation sont, nous le verrons, sans intérêt pour l'étude de l'influence de cette modification sur les propriétés biologiques des tRNA, qui sont complètement abolies dans ces conditions. Le domaine intéressant pour ces études biologiques se place au-dessous de 6 moles de sulfate de méthyle par nucléotide dans le milieu réactionnel (WEIL et coll., 1964). Pour ces faibles quantités de réactif, les expériences, même menées dans des conditions apparemment identiques, conduisent à des pourcentages de bases méthylées assez variables d'une expérience à l'autre. C'est ainsi que l'on trouve :

- pour 2 Me_2SO_4/nucléotide : 5 à 12 p. 100 de 7-méthylguanine ; de 6 à 10 p. 100 de 1-méthyladénine ; absence de 3-méthylcytosine.
- pour 4 Me_2SO_4/nucléotide : de 15 à 23 p. 100 de 7-méthylguanine ; de 10 à 13 p. 100 de 1-méthyladénine et des traces non dosables de 3-méthylcytosine.
- pour 6 Me_2SO_4/nucléotide : de 20 à 30 p. 100 de 7-méthylguanine, 10 à 15 p. 100 de 1-méthyladénine et de très faibles quantités de 3-méthylcytosine (environ 3 p. 100).

Figure 9

INFLUENCE DE LA QUANTITE DE SULFATE DE METHYLE DANS LE MILIEU REACTIONNEL SUR LA METHYLATION DU RNA EN MILIEU AQUEUX



Conditions expérimentales de méthylation : 22 heures à 4°.

Ces résultats montrent qu'il est impossible de prévoir rigoureusement les taux de méthylation qui seront obtenus dans des conditions expérimentales définies. Seule l'analyse des bases permet de connaître exactement l'intensité de la modification.

5) Méthylation des bases et nucléosides mineurs des tRNA

Les essais de méthylation, dans l'acétate de potassium 0,4 M, effectués sur les nucléosides ou les bases mineures à l'état libre, ont conduit aux résultats suivants :

- la pseudouridine et la thymine ne réagissent pas,
- l'inosine est susceptible d'être méthylée en position 1 et surtout en position 7 (JONES et ROBINS, 1963). D'après SCHEIT et HOLY (1966), le cycle imidazole de la 7-méthylinosine s'ouvre rapidement à pH 7.

III. ETUDE PHYSICOCHIMIQUE

1) Spectres d'absorption UV et ε (P) des RNA méthylés en solution aqueuse

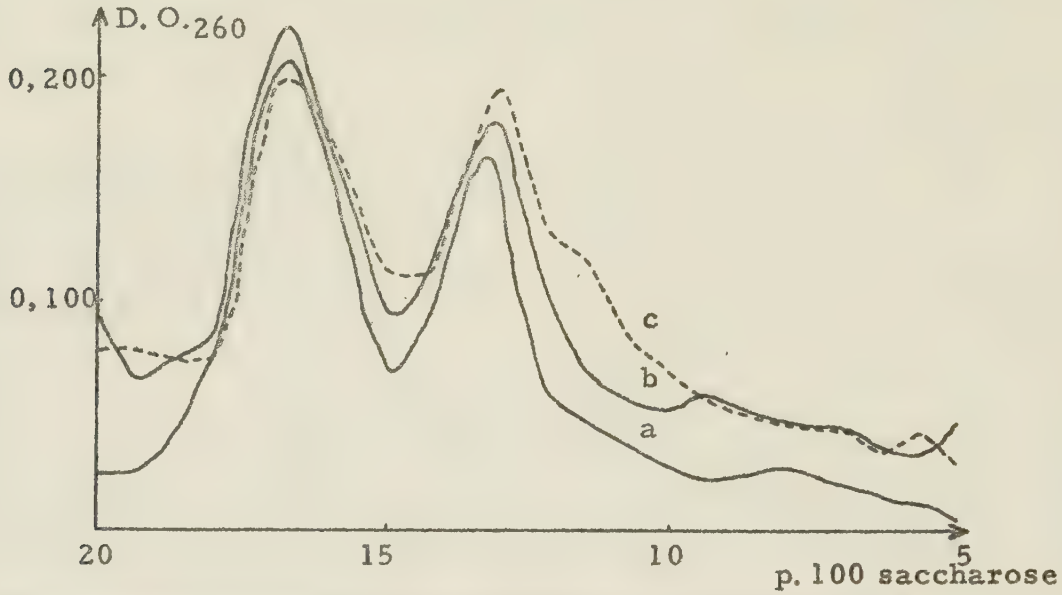
Aucune modification des spectres d'absorption UV n'est apparue au cours de la méthylation des RNA dans l'acétate de potassium. Les spectres sont superposables.

Les coefficients d'absorption moléculaire ne varient pas sensiblement. Par exemple, un RNA méthylé (12 moles de sulfate de méthyle par nucléotide, 22 heures à 4°) a présenté un ε (P) de 8 700 alors que le témoin correspondant donnait 8 800.

Comme dans le paragraphe précédent, nous avons donc appliqué le même facteur de correspondance entre la $D.O._{260}$ et la concentration en RNA. Les rendements en RNA méthylés ont, le plus souvent, atteint 80 à 90 p. 100.

Figure 10

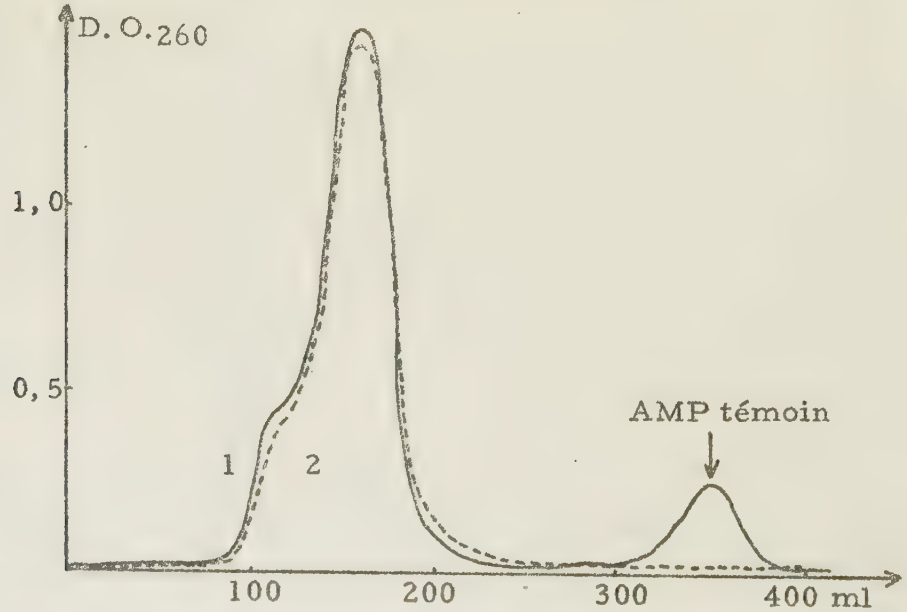
DIAGRAMMES DE SEDIMENTATION EN GRADIENT DE SACCHAROSE DE rRNA METHYLES DANS L'ACETATE DE POTASSIUM 0,4 M



Conditions expérimentales de méthylation : 22 heures à 4° .
Pourcentages de résidus guanine méthylés - a : témoin ; b : 60 p.100 ; c : 73 p.100

Figure 11

ANALYSE SUR COLONNE DE SEPHADEX G100 DE tRNA METHYLE EN MILIEU AQUEUX



Pourcentages de résidus guanine méthylés - 1 : témoin ; 2 : 85 p. 100 .

2) Intégrité de la structure primaire des rRNA

Nous avons étudié l'évolution des profils de sédimentation en gradient de saccharose de rRNA méthylés en milieu aqueux. La figure 10 montre que la dégradation du RNA ribosomal est insignifiante lorsque 60 et 70 p. 100 des restes guanine sont méthylés.

3) Intégrité de la structure primaire des tRNA

Comme on peut le voir sur la figure 11, la stabilité de la structure primaire des tRNA au cours de la méthylation en milieu aqueux est excellente. Avec la technique de filtration sur Sephadex G100, nous n'avons jamais observé de dégradation des tRNA.

Nous avons également déterminé, par ultracentrifugation analytique, les valeurs de S°_{20} de tRNA plus ou moins méthylés. Les résultats rassemblés dans le tableau IX indiquent une bonne stabilité des constantes de sédimentation.

4) Structure secondaire des tRNA

a - Etude de la courbe de fusion des tRNA dans l'acétate de potassium 0,4 M

Nous avons vérifié, au moyen des courbes de fusion, que la présence d'acétate de potassium à la concentration de 0,4 M permettait de maintenir une certaine structure secondaire dans les tRNA (de l'ordre de celle que l'on peut observer avec Mg^{++} 0,001 M). Ces résultats concordent avec les observations de FRESCO et coll. (1966), d'après lesquels une concentration suffisante en ions monovalents (Na^{+}) permet de maintenir les structures secondaires et même tertiaires de la même façon qu'une concentration beaucoup plus faible en ions Mg^{++}.

Tableau IX

CONSTANTES DE SEDIMENTATION DE tRNA METHYLES DANS L'ACETATE DE POTASSIUM

Conditions expérimentales			$\frac{\text{7-MeG}}{\text{7-MeG+G}} \times 100$	S°_{20}
Temps	t°	n *		
22 h	4°		0	3,7
			45	3,7
			57	3,4
			66	3,4
3 h	20°	0	0	3,5
		10	27	3,5
		20	53	3,3
10 min	4°	6	1	3,6
1 h		6	8	3,8
2 h		6	10	3,4
6 h		6	25	3,8

n * : nombre de moles de Me_2SO_4 par nucléotide dans le milieu réactionnel.

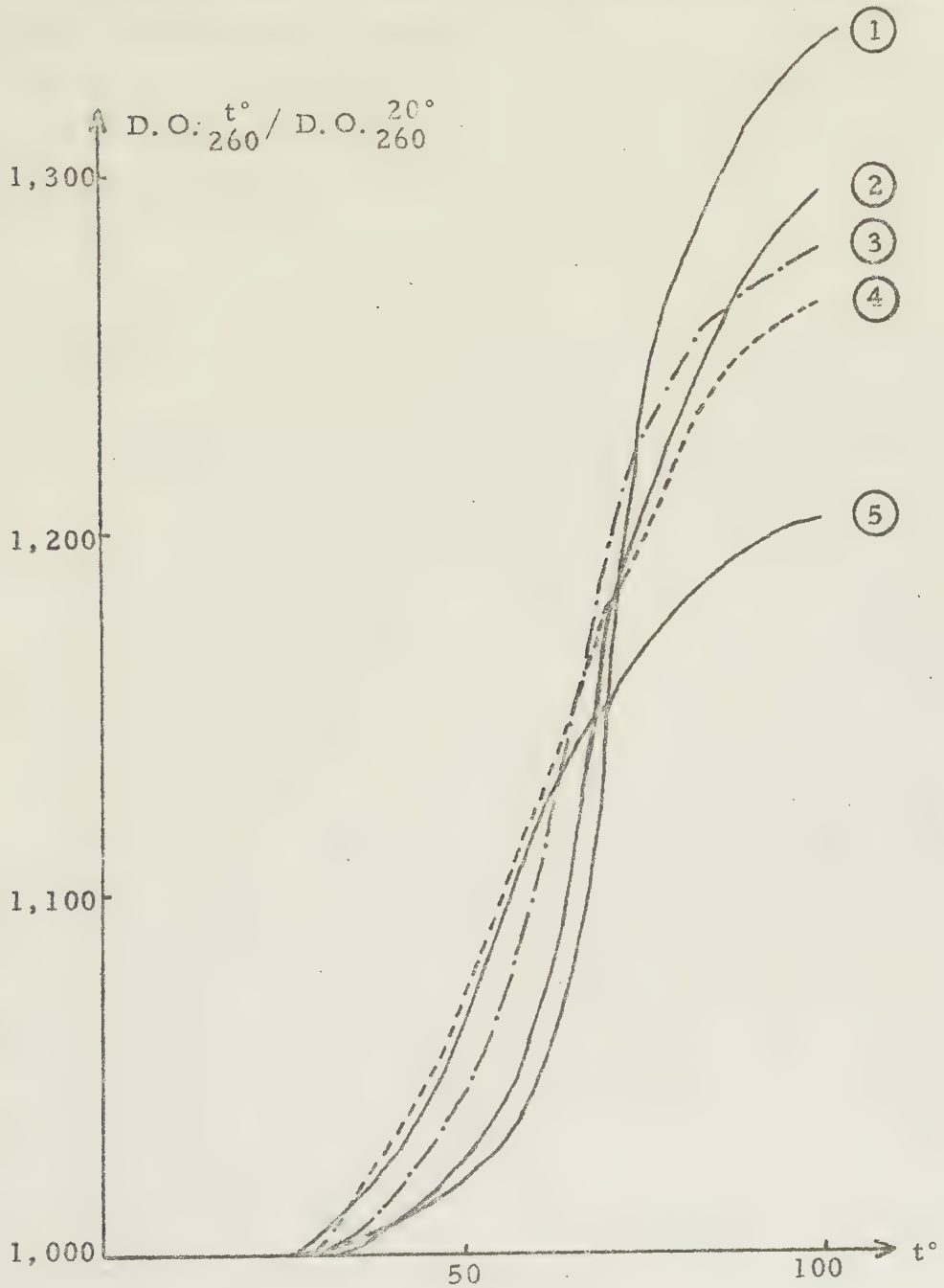
On pouvait donc, a priori, espérer que la structure secondaire des tRNA méthylés dans l'acétate de potassium 0,4 M soit moins affectée que celle des tRNA méthylés dans le DMF, solvant qui détruit la structure secondaire.

b - Influence de la méthylation sur les courbes de fusion des tRNA méthylés en solution aqueuse

La figure 12 montre une décroissance lente de l'hyperchromicité observée au cours de la "fusion" des tRNA lorsque la

Figure 12

COURBES DE FUSION DE tRNA METHYLES EN MILIEU AQUEUX



Conditions expérimentales :
tampon Tris-HCl pH 7,4 0,01 M ; NaCl 0,01 M ; Mg^{++} 0,001 M

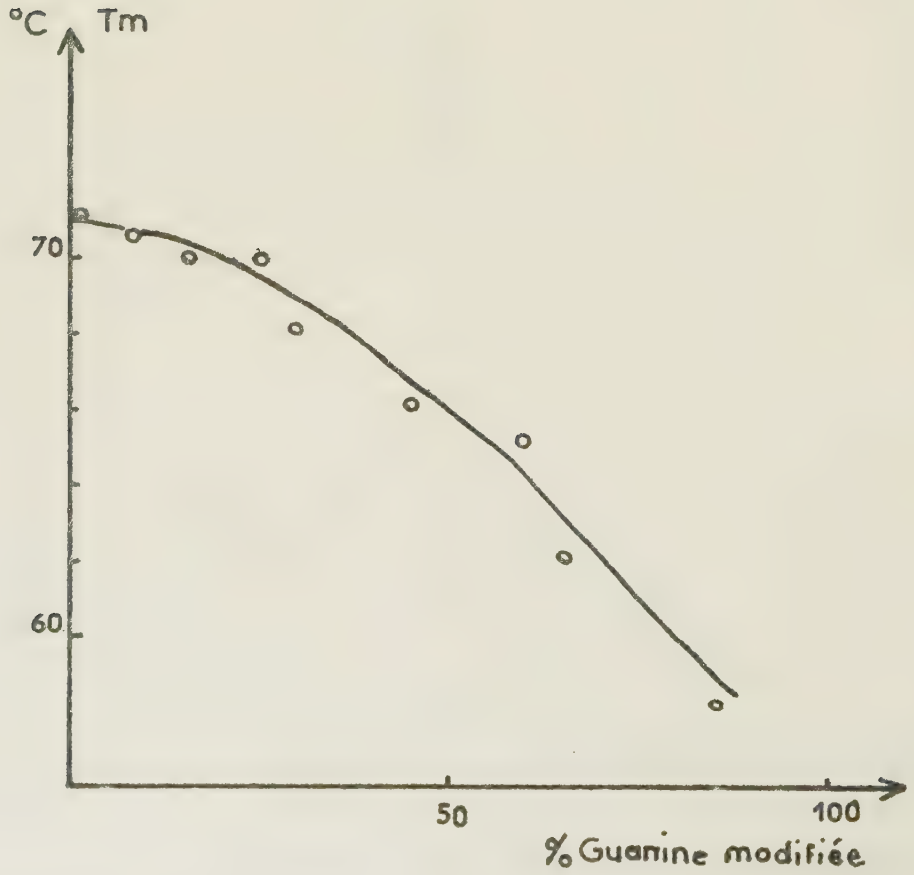
Pourcentage de résidus guanine méthylés :
1 : témoin ; 2 : 28 p. 100 ; 3 : 44 p. 100 ; 4 : 64 p. 100 ; 5 : 85 p. 100

méthylation augmente. Mais, il faut arriver à des taux de 7-méthylguanine de l'ordre de 30 p. 100 pour que la modification des courbes de fusion soit significative.

Sur la figure 13, nous voyons l'évolution des températures de demi-transition (Tm) en fonction du taux de méthylation de la guanine. Compte tenu de la précision des déterminations, on n'obtient, là encore, une baisse significative de Tm qu'à partir de 30 p. 100 de 7-méthylguanine.

Figure 13

INFLUENCE DE LA METHYLATION EN MILIEU AQUEUX
SUR LA TEMPERATURE DE FUSION DES tRNA



D. DISCUSSION

NATURE ET TAUX DES BASES METHYLEES

L'analyse des RNA méthylés par le sulfate de méthyle, aussi bien en milieu aqueux qu'en milieu DMF, montre l'apparition des dérivés suivants : 7-méthylguanine, 1-méthyladénine et 3-méthylcytosine. Dans les 2 cas, l'ordre de réactivité est :

$$G > A > C$$

Ce résultat s'oppose à une affirmation fréquemment exprimée dans des ouvrages généraux, selon laquelle seule la guanine ou seules les purines sont sensibles à l'alcoylation.

La méthylation par le sulfate de méthyle en milieu organique anhydre n'avait pas encore été étudiée. Il s'avère donc que, qualitativement, les mêmes bases sont formées qu'en milieu aqueux et avec le même ordre de réactivité. Signalons cependant qu'en milieu aqueux, il peut se former de très faibles quantités de 3-méthyladénine.

Des différences apparaissent cependant dans le taux des bases modifiées, qui est beaucoup plus élevé en milieu aqueux qu'en milieu organique. En milieu aqueux, les méthylations peuvent atteindre 95 p. 100 des résidus guanine, 50 p. 100 des résidus adénine et 15 p. 100 des résidus cytosine, alors qu'en milieu organique on n'atteint que difficilement 70 p. 100 des résidus guanine pour un très fort excès de réactif méthylant. Dans le cas de la méthylation de l'adénine et de la cytosine, les phénomènes en milieu organique sont plus compliqués : le taux de méthylation des résidus adénine atteint au maximum 12 p. 100 et celui des résidus cytosine au maximum 5 p. 100, mais en présence d'un grand excès de sulfate de méthyle, la libération d'ions H^+ conduit à une précipitation du

RNA au sein du solvant. La méthylation de l'adénine et de la cytosine est alors perturbée et devient nulle, de sorte que seule la guanine est méthylée de façon appréciable.

On remarquera que, dans ces conditions, aucune modification de l'uracile n'est observée. Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux obtenus par d'autres auteurs lors de la méthylation en milieu aqueux par le même réactif (FRAENKEL-CONRAT, 1961 - dans le cas du RNA du virus de la mosaïque du tabac) ou avec d'autres agents méthylants comme le méthane sulfonate de méthyle (BROOKES et LAWLEY, 1963) ou encore avec la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine en milieu DMF 67 p. 100 (SINGER et coll., 1968). Il est intéressant de noter que ce dernier réactif, lorsqu'il est utilisé en milieu aqueux, ne conduit qu'à la méthylation de la guanine et de l'adénine.

Inversement, dans certaines conditions, on peut arriver à méthyler l'uracile en 3-méthyluracile. C'est ainsi que POCHON et MICHELSON (1967) sont parvenus à ce résultat par action du sulfate de méthyle en milieu aqueux, en présence de tributylamine.

L'action du diazométhane en milieu hétérogène conduit au même résultat avec même une prédominance de modification de U (KRIEK et EMMELOT, 1963). Lorsque ce type de méthylation est effectué en suspension dans l'éther anhydre, une modification supplémentaire apparaît : il se forme le 1-MeG au lieu du 7-MeG (KRIEK et EMMELOT, 1963).

Dans les conditions que nous avons employées, les seuls dérivés méthylés obtenus (cf. 95) par action du sulfate de méthyle en milieu aqueux ou organique sont :

7-méthylguanine 1-méthyladénine 3-méthylcytosine

Ce résultat est en accord avec les calculs de PULLMAN et PULLMAN (1962) qui leur ont permis d'expliquer cet ordre de réactivité.

Il convient de souligner un fait important : on n'observe, dans le cas des RNA, aucune disparition de base quel que soit le milieu réactionnel. Ce résultat s'oppose à la méthylation du DNA qui conduit rapidement à une dépurination. Le remplacement du ribose par le désoxyribose empêche ce phénomène. Nos résultats confirment, à ce point de vue, une observation antérieure de LAWLEY et BROOKES (1963) qui avaient déjà fait la même constatation.

Signalons enfin que, dans nos conditions expérimentales et en accord avec les travaux de WACKER et EBERT (1959) et de SCANNELL et coll. (1959) relatifs à la méthylation de l'adénosine et de l'uridine, le -OH en 2' du ribose n'est pas méthylé.

En résumé, s'il est vrai que qualitativement les résultats obtenus en milieu aqueux et en milieu organique sont identiques, il faut souligner qu'en solution aqueuse on obtient des taux de méthylation plus élevés et une meilleure reproductibilité des résultats. Ces résultats moins favorables en milieu organique sont probablement dûs au phénomène de précipitation des RNA dans ce milieu. Cette précipitation qui perturbe la méthylation et qui pourrait être due à l'acidité formée au cours de la réaction, n'a pu être empêchée par l'addition de pyridine pour neutraliser cette acidité.

PRODUCTION DE COUPURES DANS LA CHAINE POLYNUCLEOTIDIQUE AU COURS DE LA METHYLATION

Les résultats que nous apportons dans ce travail montrent que la méthylation dans le DMF conduit à des ruptures dans les chaînes polynucléotidiques particulièrement nettes dans le cas du rRNA. Le nombre de coupures augmente avec le taux de méthylation. Toutefois, les fragments obtenus présentent encore une constante de sédimentation supérieure à 4 S, ce qui montre que le nombre de ces coupures est relativement faible. Nous nous sommes d'abord demandés si cette dégradation

n'était pas due à l'acidité libérée au cours de la réaction. Aussi avons-nous essayé de neutraliser cette acidité en effectuant la réaction en présence de pyridine. L'addition de cette base a été effectuée dans un bain de glace en raison de l'échauffement provoqué par son adjonction. Les diagrammes de sédimentation en gradient de saccharose des rRNA méthylés en présence de pyridine ont montré que le phénomène de dégradation, loin d'être évité, était au contraire accentué.

Un phénomène de dégradation analogue a été observé par DUVAL (DUVAL, 1967) au cours de la bromuration des rRNA par le brome en milieu DMF. Là aussi, l'hypothèse avait été avancée que la scission des liaisons internucléotidiques pouvait être provoquée par la libération d'acide bromhydrique. Cependant, la bromuration en présence de pyridine ou de tri-n-butylamine n'avait pas empêché la dégradation et l'addition d'une solution aqueuse de HBr à la solution de RNA dans le DMF n'avait pas suffi pour provoquer la rupture des chaînes.

L'intervention de l'acidité dans cette dégradation est d'ailleurs devenue peu plausible lorsque nous avons constaté que la méthylation en milieu aqueux laissait au contraire la chaîne des RNA intacte. En effet, lors de ce traitement, la même acidité est libérée et elle ne suffit pas à produire des coupures.

Une explication possible de la dégradation des RNA sous l'influence de la méthylation en milieu DMF pourrait être l'estérification de quelques phosphates internucléotidiques avec formation de triesters phosphoriques. Ces triesters sont instables en milieu aqueux et, lors de la régénération du sel de sodium du RNA, concomittante au passage en solution aqueuse, ils seraient hydrolysés avec rupture de la liaison internucléotidique. Signalons que KRIEK et EMMELOT (1963) ont proposé la même interprétation pour expliquer la dégradation du RNA sous l'influence du diazométhane.

La formation de triesters par action de sulfate de méthyle ne peut avoir lieu en milieu aqueux et de ce fait le phénomène d'hydrolyse des liaisons internucléotidiques ne peut se produire dans ce milieu. Ceci est confirmé par les expériences de BRIMACOMBE et coll. (1965) qui n'ont pas constaté d'estérification du phosphate internucléotidique, ni de ruptures de chaîne après méthylation du dinucléoside-phosphate ApU et des polynucléotides poly A et poly C par action du sulfate de méthyle à pH 7. Un résultat identique a été obtenu par HAINES, REESE et TODD (1964).

L'hypothèse de la formation de triesters phosphoriques n'est au fond étayée par aucun fait expérimental. Elle explique d'ailleurs mal la résistance plus grande des tRNA par rapport aux rRNA lors de leur méthylation en milieu DMF. On ne peut invoquer, pour interpréter ce phénomène, l'existence de zones en double hélice plus nombreuses dans le tRNA que dans le rRNA, ces régions étant davantage protégées contre l'action du réactif méthylant. Il a, en effet, été démontré par les études de dichroïsme circulaire de MOMMAERTS et coll. (1964), par les études hydrodynamiques de TSVETKOV et coll. (1964) et par l'étude des courbes de fusion (DUVAL, 1964) que la structure secondaire des tRNA est détruite en milieu DMF. Le fait qu'il n'apparaît pas de fragments de constante de sédimentation inférieure à 4 S montre que les points de rupture dans le rRNA sont peu nombreux et suggère que certaines liaisons internucléotidiques soient plus facilement attaquées par les groupes méthyle, même en l'absence de toute structure secondaire. L'existence de points de fragilité plus grande dans les rRNA est confirmée par la dégradation plus facile de ces rRNA par rapport aux tRNA observée lors d'un grand nombre de modifications chimiques étudiées dans notre laboratoire : bromuration (DUVAL et EBEL, 1965 a), chloruration (DUVAL et EBEL, 1967), acétylation (KEITH et EBEL, 1968 a, b). Les raisons de cette instabilité particulière du rRNA sont encore inconnues.

DESTABILISATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE SOUS L'INFLUENCE DE LA METHYLATION

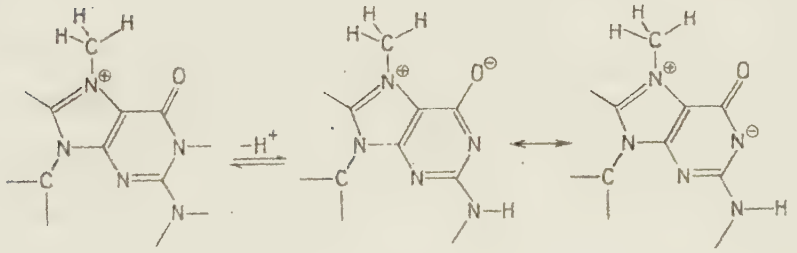
La structure secondaire des tRNA est rapidement altérée lors de la méthylation en milieu DMF. Par contre, en milieu aqueux, cette désorganisation n'est sensible que pour des taux de méthylation assez élevés. Cette différence s'interprète par la disparition de la structure secondaire en milieu organique que nous venons d'évoquer et qui permet la méthylation de bases situées dans les zones normalement hélicoïdales du tRNA. En effet, on conçoit aisément que la méthylation en N_1 de l'adénine ou en N_3 de la cytosine empêche la reformation des liaisons hydrogène lors du passage en milieu aqueux. Mais, nous verrons plus loin que même la méthylation en N_7 de la guanine, non impliqué dans l'appariement des bases de la liaison G-C, peut empêcher cet appariement par un effet secondaire.

Le fait que la méthylation des tRNA en milieu aqueux affecte beaucoup moins la structure secondaire suggère que les zones en double hélice sont protégées contre l'action du sulfate de méthyle. Nous avons déjà indiqué que la concentration 0,4 M en acétate de potassium, milieu dans lequel se fait la méthylation, est suffisante pour stabiliser la structure secondaire. Nous verrons, plus loin, que cette propriété peut être mise à profit pour la caractérisation des zones restant accessibles dans la structure secondaire ou tertiaire des tRNA.

Il reste cependant à expliquer la désorganisation de la structure secondaire observée, en milieu aqueux, pour des taux de méthylation élevés. Cette désorganisation peut s'expliquer par la méthylation de la guanine qui entraîne l'apparition d'une charge positive au niveau de N_7. Quoique cette position n'intervienne pas dans l'appariement des bases, il est probable que la méthylation, à son niveau, entraîne la désorganisation des appariements G-C pour deux raisons. En premier lieu, l'apparition de charges positives modifie l'équilibre des charges au sein de

la molécule de tRNA et peut ainsi entraîner une déformation de celle-ci, se traduisant par un affaiblissement des structures hélicoïdales. Une deuxième interprétation, plus précise, a été proposée par LAWLEY et BROOKES (1961) et par KRIEK et EMMELOT (1963), selon lesquels l'apparition de la charge positive au niveau de N_7 entraîne la formation de charge négative selon le schéma 2 et ce remaniement se traduirait par la disparition de H en N_1 impliqué dans l'appariement G-C.

Schéma 2



Les nombreux travaux effectués sur les homopolymères par MICHELSON et ses collaborateurs viennent à l'appui de ces hypothèses. Ces auteurs ont préparé le poly-N_1-méthylA avec 70 p. 100 de A méthylé (MICHELSON et GRUNBERG-MANAGO, 1964) et poly-N_7-méthylG (MICHELSON et POCHON, 1966). Poly-N_1-méthylA ne forme pas de complexe très stable avec poly U (LUDLUM, 1966 b ; POCHON et MICHELSON, 1967). D'autre part, la stabilité du complexe poly C + poly-N_7-méthylG est très inférieure à celle du complexe poly G - poly C. Dans le complexe poly G - poly C, seul G est méthylé par le sulfate de méthyle ; ceci prouve que la structure secondaire peut protéger certains sites (ici N_3 de C).

E. CONCLUSION

Une première conclusion de cette étude comparée de la méthylation par le sulfate de méthyle en milieu aqueux et en milieu DMF est que cette modification chimique est relativement peu spécifique. En milieu aqueux, la méthylation des purines est prédominante, mais on observe également une faible méthylation de la cytosine. En milieu diméthylformamide, au-delà d'une certaine quantité de réactif ajoutée, la réaction devient plus spécifique puisque seul G est méthylé d'une manière appréciable, mais l'emploi du réactif organique entraîne toute une série d'autres inconvénients qui enlèvent l'intérêt de cette spécificité plus élevée.

A tous points de vue, la méthylation en milieu aqueux est préférable à celle en milieu organique. En milieu aqueux, les taux de méthylation sont plus élevés qu'en milieu organique, à dose égale de réactif, et les résultats sont aussi plus reproductibles. De plus, l'idée de base selon laquelle les risques d'hydrolyse des liaisons internucléotidiques étaient plus grands en milieu aqueux qu'en milieu organique ne s'est pas vérifiée. Au contraire, c'est en milieu organique que la méthylation produit des coupures en raison peut-être de la formation d'esters phosphoriques trisubstitués. Enfin, du fait de la disparition de la structure secondaire en milieu organique, l'effet du sulfate de méthyle se traduira par une localisation au hasard des substitutions dans la chaîne polynucléotidique et par conséquent par une restauration de la structure secondaire plus difficile que lorsque les tRNA sont directement méthylés en milieu aqueux. Dans ce dernier cas, surtout lorsque la méthylation est effectuée en présence d'ions Mg^{++} stabilisant la configuration des tRNA, on peut espérer que l'action du réactif se limitera aux régions en dehors des zones en double hélice dans la mesure où ces régions ne sont pas

protégées par la structure tertiaire. Nous verrons, plus loin (chapitre VI), un essai d'application de la méthylation à la reconnaissance de ces zones accessibles dans les tRNA.

Cependant, cette approche ne sera valable que pour des quantités de sulfate de méthyle inférieures à 6 Me_2SO_4/P car on observe, pour de trop fortes méthylations, une déstabilisation de la structure secondaire. C'est là un des inconvénients de la réaction de méthylation des RNA par le sulfate de méthyle en milieu aqueux.

CHAPITRE III

ALLYLATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

INTRODUCTION

Après avoir étudié la méthylation des RNA, nous avons recherché un réactif alcoylant qui permette d'obtenir un substituant dont le nombre de carbone soit plus élevé. A la suite d'essais préliminaires positifs, nous avons choisi le bromure d'allyle $CH_2=CH-CH_2Br$.

Le radical allylique se rapproche d'un groupement que l'on trouve à l'état naturel, le reste γ, γ-diméthylallyl- (ou isopentényl-) $(CH_3)_2C = CH-CH_2-$. En effet, la N_6-isopenténylad énosine (ou ipA) a été isolée du tRNA de levure par HALL et coll. (1966) ; ZACHAU, DÜTTING et FELDMANN (1966 b) ont localisé ce même dérivé dans la séquence de deux tRNA spécifiques de la sérine extraits de la levure de bière. La N_6-isopenténylad énosine appartient au groupe des cytokinines, substances qui agissent comme facteurs de croissance en favorisant la division cellulaire et dont la structure est celle de dérivés N_6- substitués de l'adénosine. Parmi les cytokinines, la zéatine ou 6-(4-hydroxy-3-méthyl-trans-2-butényl-amino)purine contient également un reste allyl γ, γ-disubstitué (LETHAM, SHANNON et Mc DONALD (1964). D'autre part, un alcaloïde retiré des feuilles de Gleditschia triacanthos, la triacanthine, correspond à la γ, γ-diméthylallyl-3-adénine ; cette structure établie par LEONARD et DEYRUP a été confirmée par DENAYER (à ce sujet, voir DENAYER, 1962).

Dans la littérature, nous n'avons relevé qu'un petit nombre de descriptions de dérivés allylés de bases puriques ou pyrimidiques.

On peut signaler la préparation de la 6-allylaminopurine par OKUMURA et coll. (1959) et les travaux de ABSHIRE et BERLINGUET (1964) qui ont obtenu la 3-allyladénine en traitant l'adénine en solution dans le DMF par le bromure d'allyle. MINNEMEYER et coll. (1961) ont préparé le 5-allyluracile et MINNEMEYER, TIECKELMANN et HOLLAND (1963) la 5-allyluridine. MONTGOMERY et HEWSON (1965) ont synthétisé la 5-allyl-2'-desoxyuridine. MONTGOMERY et THOMAS (1965) ont également utilisé l'allylation en vue de la synthèse de purines N-substituées ; ils ont ainsi obtenu la 9-allyladénine et la 9-allylhypoxanthine, par action du bromure d'allyle sur la base purique, en présence de K_2CO_3.

Nous avons étudié, tout d'abord, l'action du bromure d'allyle sur les ribonucléosides en milieu organique (diméthylformamide) ou en milieu aqueux et étudié le comportement chromatographique des dérivés allylés formés. D'autre part, il a été recherché si les produits obtenus étaient stables au cours de l'hydrolyse perchlorique telle qu'elle est pratiquée en vue de l'analyse des bases des RNA. L'étude a été réalisée ensuite sur le RNA et nous avons caractérisé les dérivés allylés formés.

PARTIE EXPERIMENTALE

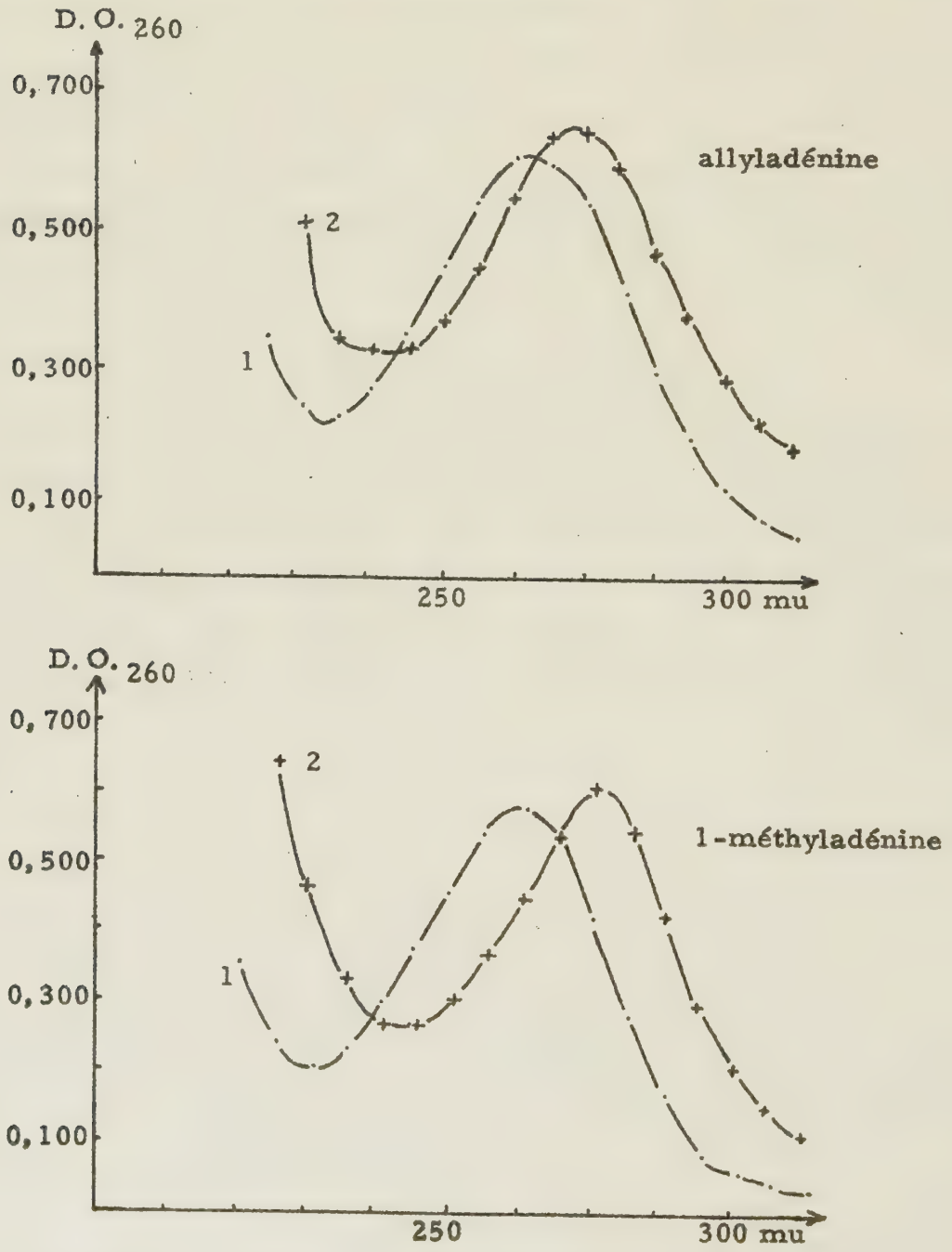
A. REACTIF D'ALLYLATION

Comme agent d'allylation, nous avons employé le bromure d'allyle puriss. (FLUKA) préalablement distillé. Les caractéristiques de ce réactif sont les suivantes :

Formule	$CH_2=CH-CH_2-Br$
M	121
d_4^{20}	1,398
E_{760}	70°

Figure 14

SPECTRES ULTRAVIOLETS DE L'ALLYLADENINE ET DE LA 1-METHYLADENINE



Courbes n° 1 : milieu HCl N

2 : pH 12

Tableau X

CARACTERISTIQUES DES DERIVES OBTENUS APRES ALLYLATION DE L'ADENOSINE SUIVIE D'HYDROLYSE PERCHLORIQUE

N°	Rf_I	Solvant II $\frac{Rf}{Rf(adénine)}$	λmax	λmin	$\frac{D.O._{250}}{D.O._{260}}$	$\frac{D.O._{280}}{D.O._{260}}$	pH	Attribution
1	0,34	1,00	262	229	0,78	0,39	1	adénine
			269	237	0,57	0,60	12	
2	0,48	1,58	262	232	0,78	0,52	1	1-allyladénine
			268	242	0,68	0,84	12	

Tableau XI

CARACTERISTIQUES DES DERIVES OBTENUS APRES ALLYLATION DE LA GUANOSINE SUIVIE D'HYDROLYSE CHLORHYDRIQUE

N°	Rf_I	Solvant II		pH 1				Attribution
		$\frac{Rf}{Rf(guanine)}$	$\frac{Rf}{Rf(adénine)}$	λmax	λmin	$\frac{D.O._{250}}{D.O._{260}}$	$\frac{D.O._{280}}{D.O._{260}}$	
1	0,20	1,00	0,22	248	223	1,30	0,76	guanine
g_1	0,42	5,4	1,20	250	230	1,26	0,71	7-allylguanine
g_2	0,76	5,3	1,17	255	232	1,00	0,70	

B. ALLYLATION DES RIBONUCLEOSIDES

I. ALLYLATION DES RIBONUCLEOSIDES EN MILIEU DIMETHYLFORMAMIDE

1) Adénosine

A 0,15 millimole d'adénosine en solution dans 5 ml de DMF, nous avons ajouté 0,10 ml de bromure d'allyle, soit environ 7 fois la quantité stoechiométrique. Après chauffage au bain-marie jusqu'à dissolution complète du nucléoside, le mélange a été laissé 2 heures à 37°.

Par chromatographie bidimensionnelle sur papier (selon la technique décrite pour les RNA), nous avons trouvé une nouvelle tache (Rf_I = 0,52) en plus de l'adénosine (Rf_I = 0,34).

Si l'on évapore à sec une partie de la solution précédente et qu'on la soumette à une hydrolyse perchlorique selon la technique utilisée pour l'hydrolyse du RNA, on observe sur les chromatogrammes deux taches, l'une dont les Rf et les caractéristiques spectrales sont ceux de l'adénine et l'autre correspondant au produit d'allylation. Le tableau X contient les caractéristiques des produits obtenus après hydrolyse perchlorique. On retrouve les 3/4 de l'adénine intacte, sous forme non transformée. Le spectre de la nouvelle tache est analogue au spectre de la 1-méthyladénine (figure 14), ce qui est en accord avec l'hypothèse de la formation de 1-allyladénine.

2) Guanosine

En solution dans le DMF, la guanosine a été traitée par le bromure d'allyle comme précédemment. La dissolution du nucléoside a nécessité un chauffage prolongé. Les produits obtenus (Rf_I = 0,29 - 0,55 - 0,80) correspondent à des dérivés stables à l'hydrolyse perchlorique. Le tableau XI rapelle les caractéristiques des dérivés apparus.

La tache g_1 est de beaucoup la plus intense. Son spectre d'absorption UV a fait l'objet d'une étude systématique à différents pH. La figure 15 représente trois de ces spectres qui montrent l'évolution selon le pH. Par analogie avec les spectres de la 7-méthylguanine, représentés sur la même figure, nous pouvons supposer que g_1 est la 7-allylguanine. Cette hypothèse s'accorde avec le fait que N_7 de la guanine est le site le plus réactif, dans cette molécule, vis-à-vis des agents alcoylants. Une petite quantité de ce dérivé a été isolée ; son spectre IR, de même que le spectre UV, est compatible avec la formule proposée. D'autre part, le dérivé d'allylation de la guanosine présente une fluorescence bleue, caractéristique des dérivés guanyliques N_7, N_9-disubstitués. Nous n'avons pas étudié de façon plus approfondie la tache g_2, car nous verrons qu'elle n'apparaît pas dans l'allylation des RNA.

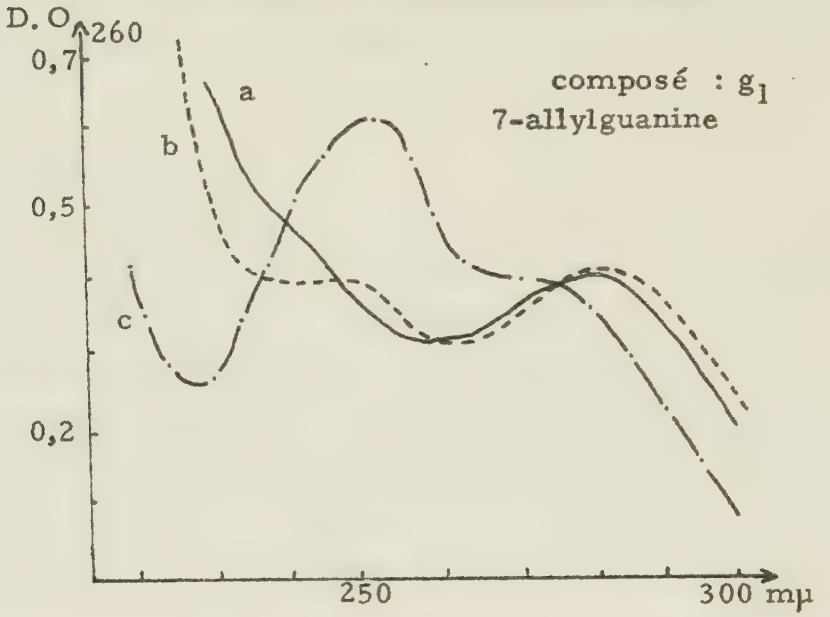
3) Cytidine

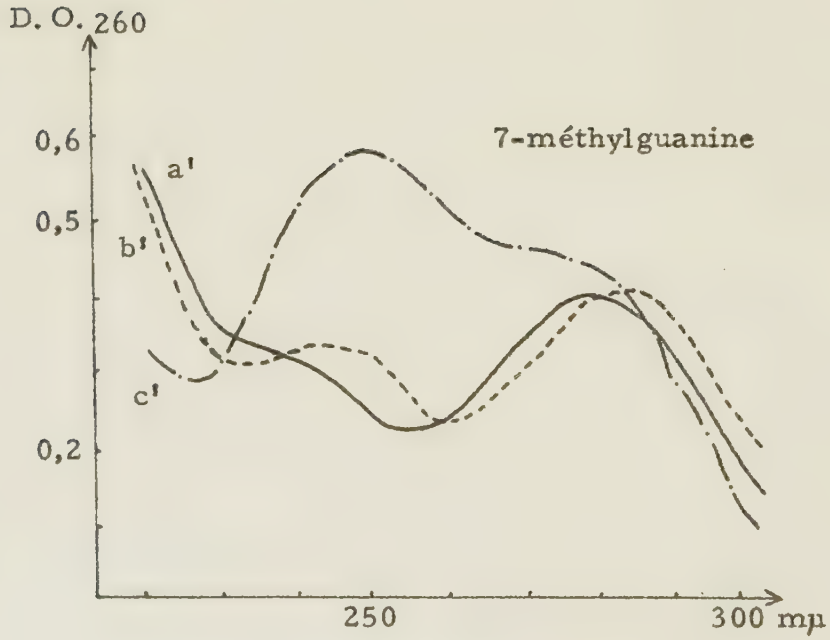
A 1 millimole de cytidine en solution dans 5 ml de DMF, on a ajouté 0,5 ml de bromure d'allyle, soit environ 5 fois la quantité stoechiométrique. Le mélange a été traité de la même façon que pour l'adénosine.

Par chromatographie, nous avons pu révéler plusieurs taches absorbant en UV. En plus de la cytidine (Rf_I = 0,43) (dont la D.O. représente 10 p. 100 de la D.O. totale), on observe surtout une tache de Rf_I = 0,70. Après hydrolyse perchlorique, les caractéristiques des dérivés obtenus sont rassemblées dans le tableau XII. Un bilan réalisé à partir des densités optiques montre qu'il n'y a pas eu de disparition de matériel absorbant en UV. L'hydrolyse perchlorique n'a donc pas détruit le dérivé allylé. Les caractéristiques spectrales du produit d'allylation de la cytosine, à pH 1 et 10, présentent des analogies très nettes avec le spectre de la 3-méthylcytosine, ce qui est en accord avec la formation de 3-allylcytosine.

Figure 15

SPECTRES ULTRAVIOLETS DE L'ALLYLGUANINE ET DE LA 7-METHYLGUANINE





Conditions expérimentales :

a et a'	:	milieu HCl N
b	:	pH 4
b'	:	pH 6
c	:	pH 11
c'	:	pH 13

Tableau XII

CARACTERISTIQUES DES DERIVES OBTENUS APRES ALLYLATION DE LA CYTIDINE SUIVIE D'HYDROLYSE PERCHLORIQUE

N°	Rf solvant I	Rf/Rf(cytosine) solvant II	λmax	λmin	$\frac{D.O._{250}}{D.O._{260}}$	$\frac{D.O._{280}}{D.O._{260}}$	Attribution
1	0,44	1,00	274	238	0,45	1,53	cytosine
2	0,72	2,56	277	243	0,49	1,55	3-allyl-cytosine

4) Uridine

Le traitement de l'uridine, dissoute dans le DMF, par le bromure d'allyle n'a jamais permis d'observer de nouvelles taches sur les chromatogrammes. Le spectre UV de l'uridine après action du bromure d'allyle est identique à celui de l'uridine initiale. On retrouve 100 p. 100 du nucléoside.

Ce résultat rappelle l'inertie de l'uracile que nous avons déjà constatée vis-à-vis du sulfate de méthyle.

5) Nucléosides et bases mineures

Les essais d'allylation par le bromure d'allyle effectués sur la thymine et la pseudouridine ont conduit à des résultats négatifs. Par contre, avec l'inosine, on obtient un nouveau dérivé dont le Rf dans le solvant I est supérieur à celui de l'inosine. Par analogie avec la méthylation, il pourrait s'agir de la 1-allylinosine ou de la 7-allylinosine.

6) Recherche de l'allylation du ribose

Sur les chromatogrammes des nucléosides traités par le bromure d'allyle en milieu diméthylformamide, la recherche du ribose a été effectuée selon la technique de révélation décrite chapitre II. Toutes les taches visibles en UV ont conduit à un résultat positif. On peut donc conclure que les -OH du ribose ne réagissent pas avec le bromure d'allyle dans les conditions que nous avons adoptées.

II. ESSAIS D'ALLYLATION DES RIBONUCLEOSIDES EN MILIEU AQUEUX

Toutes les tentatives d'allylation par le bromure d'allyle en milieu acétate de potassium 0,4 M ont conduit à des résultats négatifs. Les produits de départ sont restés intacts (Rf dans différents solvants, spectres UV).

C. ALLYLATION, EN MILIEU DMF, DE DINUCLEOSIDES-PHOSPHATES DU TYPE GpX

I. CONDITIONS EXPERIMENTALES

Cette étude a été effectuée sur les guanylyl-(3'-5'-)nucléosides GpA, GpG, GpC et GpU (WALDHOF, Mannheim).

A 5 µmoles de dinucléoside-phosphate en solution dans 3 ml de DMF, un grand excès de bromure d'allyle (0,5 ml) a été ajouté. Le mélange réactionnel a été chauffé au bain-marie à 37° jusqu'à dissolution complète des réactifs et laissé ensuite 2 heures à 37°. Après addition de 100 ml d'eau distillée, la solution a été lyophilisée. Le résidu a été repris par 1 ml d'eau distillée.

II. ANALYSE DES PRODUITS DE REACTION

Les dinucléosides-phosphates allylés ont été soumis à une hydrolyse par HCl N, 1 heure à 100°. On obtient ainsi les dérivés puriques sous forme de bases et les dérivés pyrimidiques sous forme de nucléosides étant donné qu'ils ne sont localisés que dans la deuxième position du dinucléoside-phosphate GpX. L'analyse des produits de la réaction d'allylation ne nous a jamais permis de mettre en évidence des modifications de l'adénine, de la cytidine ou de l'uridine. Seule la 7-allylguanine a été trouvée. Les taux d'allylation de la guanine ont atteint 90 p. 100 (voir tableau XIX).

Ce résultat n'est pas surprenant pour U puisque ce nucléoside ne réagit pas avec le bromure d'allyle. Par contre, il est intéressant de constater que l'adénine et la cytosine, qui peuvent être allylées sous forme de nucléosides libres, ne sont plus modifiées lorsqu'elles sont engagées dans le dinucléoside-phosphate.

III. STABILITE DE LA LIAISON PHOSPHODIESTER

Le produit de la réaction d'allylation a été chromatographié sur Sephadex G 10, avec comme éluant NaCl 0, 05 M ou H_2O. Nous avons généralement obtenu deux pics qui sont élués beaucoup plus rapidement que des nucléotides ou des nucléosides simples. Les spectres correspondent à ceux des dinucléosides-phosphates. Les pics élués correspondent vraisemblablement aux dinucléosides-phosphates témoin et allylé. Il semble donc que, malgré le pourcentage élevé d'allylation de la guanine, la liaison phosphodiester ne soit que très rarement rompue en milieu DMF.

D. ALLYLATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

I. ALLYLATION DES RNA EN MILIEU DIMETHYLFORMAMIDE

Cette étude a été effectuée sur des RNA de levure.

1) Description de la technique

La réaction a été réalisée par action du bromure d'allyle sur des RNA dissous dans le DMF sous forme de sels de triméthylhexadécylammonium, dans des conditions identiques à celles décrites pour la méthylation (chapitre III). De même que dans la méthylation, si la quantité de bromure d'allyle ajoutée est élevée, un trouble apparaît, dû à la précipitation du RNA.

2) Etude chimique des RNA allylés

a- Nature des dérivés obtenus

Les RNA, après avoir été soumis à l'action du bromure d'allyle, ont été hydrolysés par $HClO_4$ et chromatographiés selon la technique déjà décrite. Comme dans le cas des dinucléosides-phosphates, nous n'avons jamais décelé, à côté des bases normales, qu'une seule tache supplémentaire ; les Rf et le spectre UV de ce composé sont identiques à ceux du dérivé g_1 que nous avions obtenu après hydrolyse du produit d'allylation de la guanosine. Nous avons vu qu'il s'agit de la 7-allylguanine.

Dans le cas des tRNA, nous n'avons pas étudié la formation éventuelle de dérivés allylés des bases mineures. Nous avons vu que l'inosine libre peut être allylée. Il n'est donc pas impossible qu'elle soit allylée dans les tRNA, mais cela n'est pas certain vu la diminution de réactivité des bases lorsqu'elles sont engagées dans la chaîne polyribonucléotidique.

b - Expression des résultats

L'absence de réactivité de l'uracile dans la réaction d'allylation nous a permis d'établir, comme dans la méthylation, le rapport adénine/uracile ou cytosine/uracile. Ces rapports ne sont pratiquement pas modifiés au cours de l'allylation, ce qui confirme l'absence de réaction de ces deux bases. En ce qui concerne la guanine, nous avons établi le degré d'allylation

$$d = \frac{m \times 100}{m + n}$$

avec m = $D.O._{250}$ de l'allylguanine x volume d'élution

n = $D.O._{250}$ de la guanine x volume d'élution.

Le rapport $(m + n)/(D.O._{max}$ uracile x volume d'élution) est généralement constant, ce qui montre qu'il n'y a pas de pertes de guanine au cours de l'allylation. Ce résultat a été confirmé par l'absence de matériel nucléotidique absorbant en UV aussi bien dans le surnageant de la précipitation du RNA allylé que dans le dialysat de la solution de ce RNA allylé.

c - Influence de la quantité de bromure d'allyle ajoutée par nucléotide dans le milieu réactionnel

La variation du taux d'allylation des RNA a été étudiée en fonction du rapport bromure d'allyle / nucléotide dans le milieu. Des quantités croissantes de réactif ont été ajoutées à des aliquotes des solutions de RNA dans le DMF. Dans le cas du tRNA, les expériences ont été réalisées à 4°, 37° ou 50° et pour le rRNA uniquement à 4°.

On peut constater sur le tableau XIII que le taux d'allylation augmente avec la quantité de réactif ajoutée. Mais, même avec un très fort excès de réactif, le taux d'allylation des tRNA reste relativement peu élevé. La valeur maximale du taux de modification de la guanine

Tableau XIII

VARIATION DE L'ALLYLATION DES tRNA EN FONCTION DE LA QUANTITE DE BROMURE D'ALLYLE PAR NUCLEOTIDE DANS LE MILIEU REACTIONNEL

Moles de bromure d'allyle par nucléotide de tRNA	Température	Durée de la réaction	Degré d'allylation de G
2	4°	22 heures	0
4	4°		0
6	4°		5-6
10	4°		5-6
10	4°	130 heures	12
100	4°		22
500	4°		26
50	37°	1 heure	4
100	37°		6
500	37°		13
15	50°	15 minutes	5
75	50°		9
150	50°		19
750	50°		30
25	50°	15 minutes	5
100	50°		6
200	50°		8
500	50°		10
1000	50°		15

est d'ailleurs assez variable d'une expérience à l'autre et nous n'avons pu dépasser 30 p. 100 de résidus guanine modifiés. Des résultats similaires ont été obtenus avec le rRNA. Il est probable que cette limite d'allylation soit liée à la précipitation du RNA au cours de la réaction d'allylation, précipitation que, comme dans le cas de la méthylation, nous n'avons pu empêcher.

d - Influence de la température sur l'allylation

Les résultats consignés dans les tableaux XIII et XIV permettent de constater qu'une élévation de température augmente les vitesses de réaction des tRNA. A 50°, cet effet est particulièrement notable.

Tableau XIV

VARIATION DE L'ALLYLATION DU tRNA EN FONCTION DE LA DUREE DE REACTION

Durée de la réaction	Température	Moles de bromure d'allyle par nucléotide dans le milieu	Degré d'allylation de G
22 heures	4°	100	6
64 "	4°	100	26
150 "	4°	100	26
15 minutes	50°	1000	10
30 "	50°	1000	15
45 "	50°	1000	18
1 heure	50°	1000	20
2 "	50°	1000	23

e - Influence de la durée de réaction

Le rôle de la durée de réaction a été étudié à 4° et à 50° dans le cas des tRNA. On constate (tableau XIV) que la réaction n'est pas intantanée. L'allylation augmente lorsqu'on prolonge le temps de contact des réactifs, mais sans jamais dépasser 30 p. 100 de la guanine.

f - Essais d'amélioration du taux d'allylation par déshydratation de la solution organique de RNA

Dans l'espoir d'améliorer le rendement de la réaction d'allylation, nous avons essayé d'éliminer l'eau du milieu réactionnel en utilisant la technique mise au point par DUVAL et EBEL (1965 b) : on introduit, dans une colonne chemisée et refroidie par un courant d'eau froide, une quantité d'adsorbant "MOLECULAR SIEVES" type 4 A (UNION CARBIDE C°) égale, en poids, au volume de la solution à déshydrater. La solution est introduite dans la colonne et on règle l'écoulement goutte à goutte. Après le passage de la solution, on lave à plusieurs reprises avec de faibles quantités de DMF pour réduire les pertes de RNA ; les solutions de lavage sont ajoutées à la fraction principale.

Les auteurs ont montré que, si la colonne est convenablement refroidie, la déshydratation de la solution organique ne produit aucune altération de l'intégrité moléculaire ou de l'activité biologique des tRNA.

Nous n'avons pas obtenu d'amélioration très notable du taux d'allylation de la guanine dans les RNA après passage de la solution organique sur "Molecular Sieves".

3) Etude physicochimique des RNA allylés

a - Caractéristiques spectrales des RNA allylés et coefficients d'absorption molaire

Nous avons recherché si l'allylation provoquait une modification du spectre d'absorption UV et du coefficient d'absorption molaire $\varepsilon(P)$ du RNA. Les valeurs obtenues ont été rassemblées dans le tableau XV.

Tableau XV

CARACTERISTIQUES SPECTRALES ET COEFFICIENTS D'ABSORPTION MOLAIRE DES RNA ALLYLES

Nature du RNA	Degré d'allylation de G	λ max mμ	λ min mμ	$\frac{D.O._{250}}{D.O._{260}}$	$\frac{D.O._{280}}{D.O._{260}}$	$\varepsilon(P)$
tRNA de levure de boulangerie	0	259,5	226,5	0,85	0,60	7300
	30	260	227,5	0,82	0,61	7900
tRNA de levure de bière	0	258,5	227	0,89	0,54	6400
	5	259	226,5	0,86	0,61	6900
	15	260	227,5	0,84	0,62	7600
rRNA de levure de boulangerie	0	259	226	0,85	0,55	7590
	19	259,5	226,5	0,83	0,56	9230

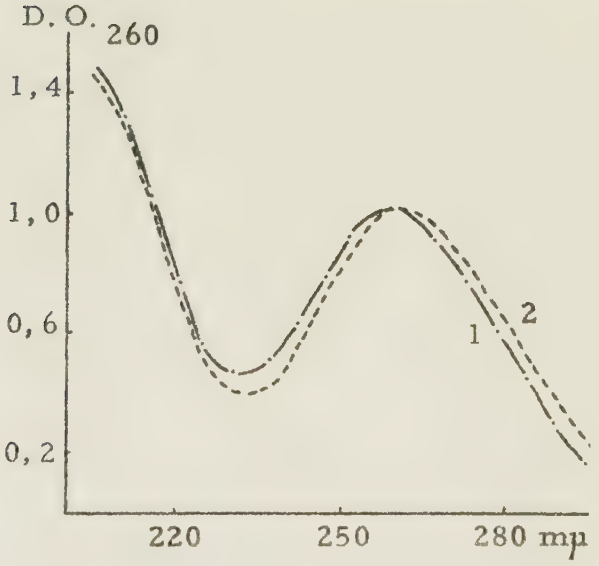
Les spectres ont été effectués en solution aqueuse.

Nous avons constaté que $\varepsilon(P)$ a tendance à augmenter au cours de l'allylation ; ce résultat doit correspondre à une certaine dénaturation des RNA.

Les spectres UV des RNA allylés présentent des caractéristiques très peu différentes des RNA témoins. On peut noter un très léger déplacement des maximums d'absorption vers les plus grandes longueurs d'onde, une augmentation du rapport $D.O._{280} / D.O._{260}$ et une diminution du rapport $D.O._{250} / D.O._{260}$. Cependant, ces variations restent faibles et les spectres n'accusent pas de modification très sensible (figure 16).

Figure 16

SPECTRES ULTRAVIOLETS DE RNA
AVANT ET APRES ALLYLATION



Conditions expérimentales : Allylation dans le diméthylformamide, 15 minutes à 50°C

1 : Témoin

2 : 1000 bromure d'allyle par nucléotide dans le milieu réactionnel

b - Intégrité moléculaire des RNA allylés

RNA ribosomal : Sur les rRNA traités par le bromure d'allyle en milieu DMF, nous avons effectué des sédimentations en gradient de saccharose. L'étude des diagrammes obtenus montre une dégradation qui s'accentue avec le degré d'allylation de la guanine. Il se forme des fractions polynucléotidiques plus légères, présentant une forte polydispersité (figure 17). La courbe C, qui correspond à une modification de la guanine d'environ 20 p. 100, ne présente déjà plus qu'un léger épaulement au niveau du premier pic.

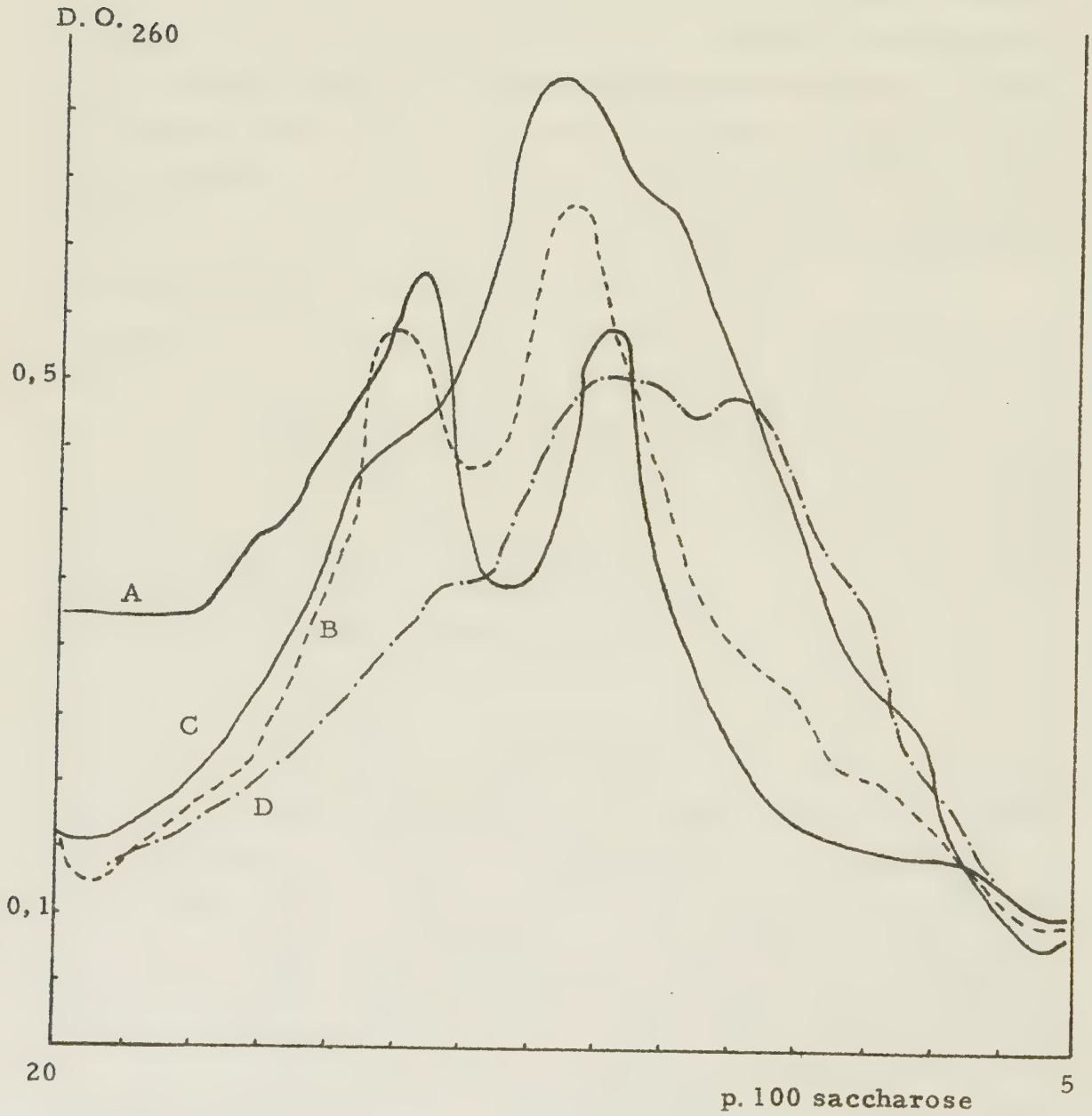
L'allylation d'un RNA ribosomal (préparé en présence de polyvinylsulfate de potassium) par une même quantité de bromure d'allyle a été effectuée à 37° (50 minutes) et à 50° (15 minutes). Alors que les taux d'allylation de la guanine étaient très voisins dans les deux RNA, le diagramme de sédimentation en gradient de saccharose du RNA allylé à 37° reste relativement bien conservé, avec seulement une diminution du premier pic au profit du second, tandis que le rRNA traité à 50° a conduit à un mélange extrêmement polydisperse, avec disparition de pics précis.

RNA de transfert : En ce qui concerne les tRNA, il faut, contrairement aux rRNA, une modification importante pour observer une dégradation. L'étude, par chromatographie sur colonne de Sephadex G 100, des tRNA traités à 50° pendant des temps très courts a conduit à des courbes assez peu différentes des courbes témoins. Par contre, le profil d'élution traduit une altération très visible si l'allylation est effectuée à 50° avec des durées supérieures à 1 heure (figure 18).

Le tableau XVI rassemble les constantes de sédimentation de quelques tRNA. On constate que les variations sont faibles et peu significatives.

Figure 17

DIAGRAMMES DE SEDIMENTATION EN GRADIENT DE SACCHAROSE DE rRNA ALLYLES DANS LE DIMETHYLFORMAMIDE

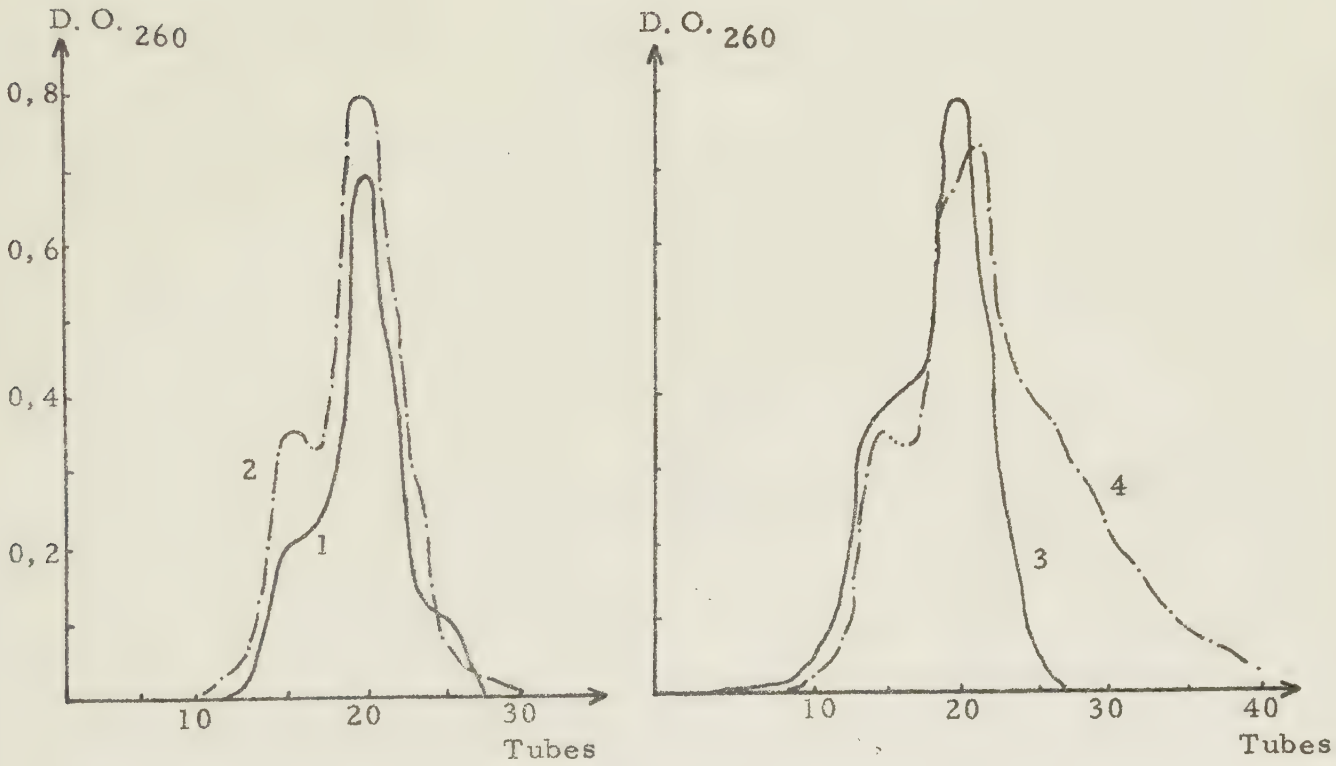


Conditions expérimentales : 22 heures à 4°C

A : témoin
B : 100 bromure d'allyle par nucléotide dans le milieu réactionnel
C : 500 bromure d'allyle par nucléotide dans le milieu réactionnel
D : 1000 bromure d'allyle par nucléotide dans le milieu réactionnel

Figure 18

ANALYSE SUR COLONNE DE SEPHADEX G100
DE RNA ALLYLES DANS LE DIMETHYLFORMAMIDE



Conditions expérimentales d'allylation : Milieu diméthylformamide, à 50°C

N°	Temps	Bromure d'allyle par nucléotide dans le milieu réactionnel	Taux d'allylation de la guanine
1	15 minutes	0	0
2	15 minutes	1000	10
3	1 heure	1000	20
4	2 heures	1000	23

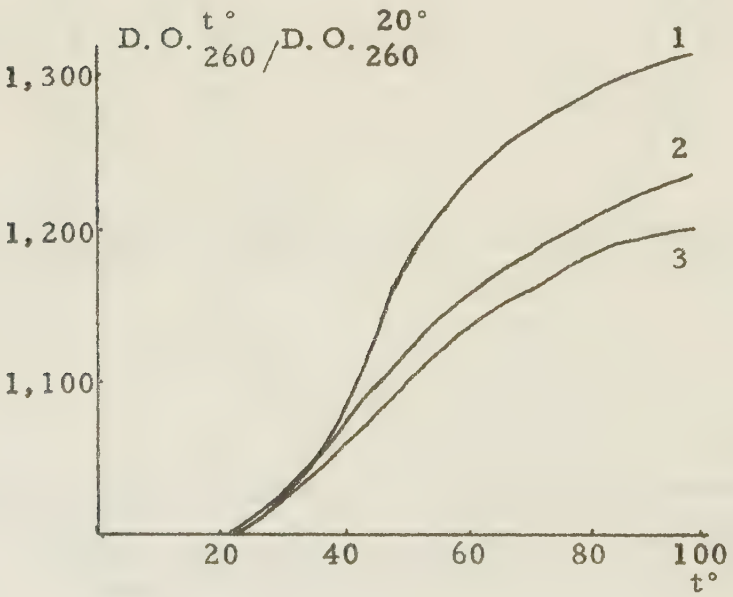
Tableau XVI

VARIATION DU COEFFICIENT DE SEDIMENTATION DES tRNA EN FONCTION DE L'ALLYLATION

Conditions expérimentales de l'allylation	Degré d'allylation de G	S°_{20}
1 heure à 37°	0	3,9
	5,5	3,7
	12,9	3,8
15 minutes à 50°	9,3	3,8
	30,0	3,5

Figure 19

COURBES DE FUSION DE tRNA ALLYLES



Pourcentage de résidus guanine allylés :

1 : 0 p. 100 2 : 12 p. 100 3 : 26 p. 100

c - Structure secondaire des tRNA allylés

L'évolution des courbes de fusion a été suivie en fonction de l'allylation. Que les courbes de fusion aient été effectuées avec ou sans Mg^{++}, l'hyperchromicité que l'on peut observer diminue si l'allylation augmente ; il en est de même pour le Tm. Le tableau XVII montre les variations d'hyperchromicité au cours de différentes expériences.

Sur la figure 19, nous avons représenté la courbe de fusion de tRNA allylés en comparaison d'un témoin.

II. ESSAI D'ALLYLATION DES RNA EN MILIEU AQUEUX

Comme avec les nucléosides libres, tous nos essais d'allylation de RNA dissous dans l'acétate de potassium 0,4 M se sont soldés par un résultat négatif.

III. ALLYLATION DE tRNA EN MILIEU AQUEUX EN PRESENCE DE DMF

Nous avons envisagé la possibilité de réaliser la réaction d'allylation sur des RNA dissous dans un mélange de DMF et d'eau. Ces conditions ont été employées pour d'autres modifications chimiques : YOSHIDA et UKITA (1965 a) ont utilisé, en vue de la cyanoéthylation de la pseudouridine dans le tRNA, un milieu aqueux (tampon phosphate + NaCl) auquel ils ont ajouté du diméthylformamide.

Les conditions expérimentales que nous avons choisies sont les suivantes :

- solution de tRNA : 11 ml par essai (soit 24,5 mg)
- DMF : 15 ml
- bromure d'allyle : 100 moles par nucléotide dissous dans le milieu
- température : 4°
- durée de la réaction : 22, 46, 120 et 160 heures.

Tableau XVII

VARIATION DE L'HYPOCHROMICITE DES tRNA APRES ALLYLATION DANS LE DMF

Conditions de la réaction	Moles de bromure d'allyle par nucléotide dans le milieu	Hyperchromicité observée par chauffage $\left(\frac{D.O._{260}\ (90\text{-}95°)}{D.O._{260}\ (20°)} \times 100\right)$
4° - 64 heures	0	31,0
	10	25,8
	100	23,5
	500	22,1
4° - 129 heures	0	31,3
	10	23,4
	100	20,5
37° - 1 heure	0	33,4
	100	30,0
	500	28,0
50° - 15 minutes	0	33,0
	15	32,6
	750	25,3
50° - 1 heure	0	29,9
	500	20,1

L'analyse des tRNA récupérés a conduit à des résultats identiques au témoin. Nous avons donc conclu à l'impossibilité de pratiquer la réaction d'allylation en milieu aqueux.

E. DISCUSSION

Signalons d'abord que la réaction d'allylation, comme la méthylation, rentre dans le cadre des substitutions nucléophiles. Mais, alors que le sulfate de méthyle agit selon une réaction de type Sn_2, c'est-à-dire avec formation d'un complexe intermédiaire selon le schéma suivant où RY représente l'agent alcoylant

$$X^- + RY \longrightarrow X^- \text{-----R-----} Y^- \longrightarrow RX + Y^-,$$

la double liaison du radical allylique permet probablement une réaction de type Sn_1, c'est-à-dire représentée par

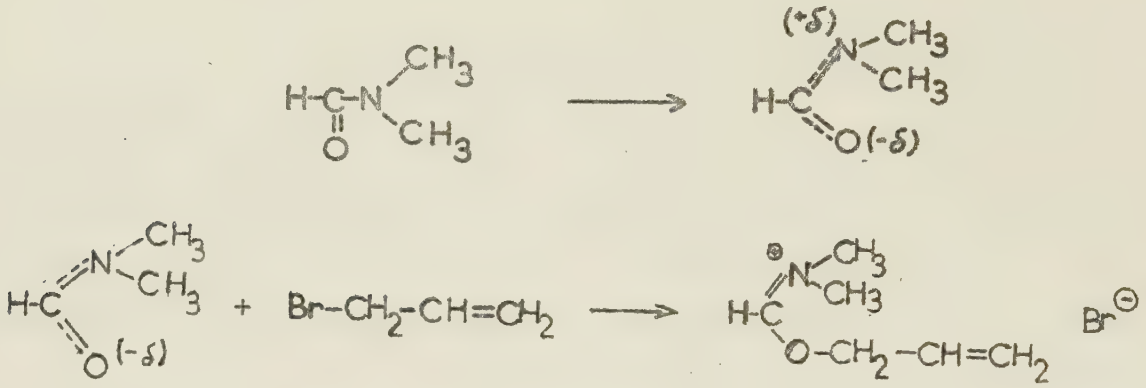
$$RY \longrightarrow R^+ + Y^-$$

$$R^+ + X^- \longrightarrow RX$$

En effet, les électrons mobiles stabilisent l'ion allylique.

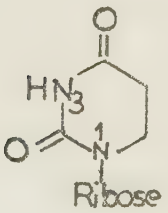
En milieu acétate de potassium 0,4 M, aucune réaction d'allylation n'a lieu, que ce soit sur les nucléosides ou sur le RNA. Ce résultat est très différent de ceux obtenus dans le chapitre précédent avec le sulfate de méthyle. Il est probable que l'hydrolyse du bromure d'allyle en milieu aqueux soit plus rapide que l'alcoylation des nucléosides. Cette hydrolyse peut, en effet, être mise en évidence par la présence d'ions Br^- dans le milieu réactionnel. On peut remarquer également que les réactions d'allylation que nous avons rappelées au début de ce chapitre ont toutes été effectuées en milieu organique.

Par contre, en milieu diméthylformamide, l'allylation des nucléosides conduit à la formation de 7-allylguanine, de 3-allylcytosine et de 1-allyladénine. Il est probable que la réaction dans le DMF se fasse par un mécanisme utilisant l'étape intermédiaire ci-dessous :

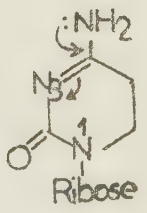


La réactivité des différents nucléosides pourrait s'expliquer de la façon suivante :

- dans les conditions de la réaction, l'azote N_3 de l'uridine n'est pas activé, de sorte qu'aucune réaction n'a lieu.
- dans la cytidine, le groupement $-NH_2$ et le doublet électronique libre sur N_1 peuvent activer la position N_3, de sorte qu'il peut se former la 3-allylcytidine.

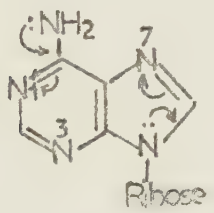


uridine

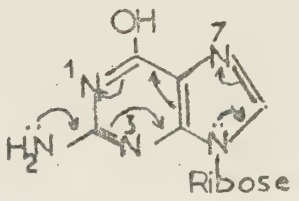


cytidine

- l'adénosine possède un $-NH_2$ qui est susceptible d'activer les positions N_1 et N_3. Il se forme effectivement avec le nucléoside la 1-allyladénine. L'azote en 7 pourrait aussi être activé grâce au doublet électronique libre de N_9. Mais il est probable que le reste $-NH_2$, trop rigide, gêne l'approche du réactif vers N_7, d'autant plus que le radical allyle est assez volumineux et peu mobile. La situation est différente dans le cas où $-NH_2$ est remplacé par -OH, c'est-à-dire dans le cas de l'inosine où la formation de la 7-allylinosine pourrait être possible.
- dans la guanosine, $-NH_2$ devrait pouvoir activer N_1, mais il est probable que le site N_7 est beaucoup plus réactif et qu'il peut être aussi activé par la présence d'un doublet libre en N_9.



adénosine



guanosine

Mais, lorsque la réaction est effectuée sur les dinucléosides phosphates du type GpX ou sur les RNA, elle n'affecte plus que la guanine. Ce résultat peut être dû au fait que la réactivité des bases, lorsqu'elles sont engagées dans une structure de type oligo- ou polynucléotidique, devient moins importante par suite de l'encombrement stérique de la molécule, de sorte que l'on observe plus de modification autre que de la guanine. Rappelons qu'une différence de réactivité des bases libres ou engagées dans les RNA a déjà été observée dans le cas d'autres réactions, comme les halogénations (bromuration : DUVAL et EBEL, 1965 a ; chloruration :

DUVAL et EBEL, 1966, 1967 ; ioduration : YOSHIDA, DUVAL et EBEL, 1966) et les modifications photochimiques (KUWANO et coll., 1968). D'autre part, nous avons utilisé des conditions de réaction relativement douces pour limiter la dégradation des RNA.

L'étude de l'influence des divers facteurs de la réaction montre que pour augmenter le taux de modification, on peut agir sur le rapport bromure d'allyle / nucléotide dans le milieu réactionnel, sur la durée et sur la température de la réaction. Dans ces conditions, on peut atteindre, dans le cas des dinucléosides-phosphates, des taux d'allylation de G de 90 p. 100. Par contre, il ne nous a pas été possible de dépasser un taux d'allylation de G de 30 p. 100 dans les RNA. Nous nous sommes demandés si cette réaction limitée n'était pas due à la présence d'eau dans le DMF, mais l'emploi de solution totalement anhydre n'a pas amélioré le rendement de l'allylation et il est probable que l'arrêt de la réaction soit lié au phénomène de précipitation qui a lieu au cours de la réaction.

Il n'est d'ailleurs pas possible d'augmenter la durée de la réaction sans affecter profondément l'intégrité moléculaire des RNA. En effet, il se produit une dégradation des chaînes de RNA plus rapide et plus sensible pour les rRNA que pour le tRNA. L'étude des rRNA en gradient de saccharose conduit à des résultats assez comparables à ceux qui avaient pu être observé au cours de la méthylation des RNA dans le DMF.

L'apparition de coupures dans la chaîne des RNA, que nous avons déjà discutée dans le cas de la méthylation en milieu DMF, se retrouve donc dans le cas de l'allylation. Mais, alors que dans la méthylation la dégradation peut être évitée en réalisant la modification en milieu aqueux, dans le cas de l'allylation cette possibilité ne nous est pas offerte étant donné que le bromure d'allyle n'agit pas en milieu aqueux. L'interprétation de cette dégradation des RNA en milieu DMF est aussi difficile

dans le cas de l'allylation que dans celui de la méthylation. Pour cette dernière modification, nous avions évoqué la possibilité de la formation de triesters phosphoriques instables en milieu aqueux. Il apparaît, à la suite de notre étude de l'allylation des dinucléosides-phosphates, que la formation de tels phosphotriesters n'a lieu que d'une manière très limitée puisque l'allylation, bien qu'elle affecte 90 p. 100 de G, laisse la structure de ces composés quasi intacte. Dans le cas des RNA, il resterait à expliquer pourquoi ce phénomène se limiterait, comme dans la méthylation, à quelques régions peu nombreuses dans le rRNA (car dans l'allylation comme dans la méthylation, il n'apparaît pas de fragments de très petit poids moléculaire) et surtout pourquoi ce phénomène ne se produit que très faiblement dans le cas des tRNA, beaucoup plus stable que les rRNA. Là encore, on ne peut invoquer la structure secondaire des tRNA étant donné que cette dernière disparaît en milieu DMF.

L'allylation produit une altération de la structure secondaire des tRNA d'autant plus importante que le degré d'allylation de la guanine est plus élevé. Cette déstabilisation de la structure secondaire peut s'interpréter par un mécanisme analogue à celui que nous avons décrit pour les RNA méthylés. Il faut remarquer que, dans le cas de l'allylation où la réaction est spécifique de G, on ne peut invoquer la modification en N_1 de A ou en N_3 de C, positions intervenant dans l'appariement des bases. Ici, on est obligé de ne tenir compte que de la substitution en N_7 de G, ce qui rend d'autant plus plausible le mécanisme de remaniement de charges, consécutif à l'apparition de la charge positive au niveau de N_7, que nous avons décrit par la méthylation.

F. CONCLUSION

L'allylation des acides ribonucléiques par le bromure d'allyle en milieu diméthylformamide représente une réaction intéressante

par sa spécificité : parmi les bases principales, elle ne touche que la guanine dès que les bases sont engagées dans une structure oligo- ou polynucléotidique.

Par contre, cette réaction présente quelques limitations. Le fait que le bromure d'allyle ne réagisse qu'en milieu DMF représente un inconvénient car, dans ces conditions, la structure secondaire des RNA est altérée. Il en résulte que la modification ne pourra être limitée, comme dans le cas de la méthylation réalisable en milieu aqueux, aux zones laissées accessibles par la structure secondaire ou tertiaire (voir chapitre VI). Un autre inconvénient est que la réaction conduit à des altérations de la structure des RNA : production de ruptures internucléotidiques surtout dans le cas des rRNA, déstabilisation de la structure secondaire dans le cas des tRNA.

Cependant, nous verrons dans le prochain chapitre que la réaction d'allylation peut trouver une application intéressante dans les études de structure des RNA.

TROISIEME PARTIE

APPLICATION DES REACTIONS D'ALCOYLATION A L'ETUDE DE LA STRUCTURE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

INTRODUCTION

Les modifications chimiques des acides ribonucléiques ont été utilisées pour l'étude la structure de ces macromolécules. L'emploi de ce type de méthode peut être envisagé sous le double aspect de la détermination de la structure primaire, c'est-à-dire de la séquence des nucléotides de la chaîne polynucléotidique et de la détermination de la structure secondaire et tertiaire, en d'autres termes de la conformation générale de la molécule.

Nous allons étudier, dans cette troisième partie, la contribution des réactions de méthylation ou d'allylation à de telles recherches.

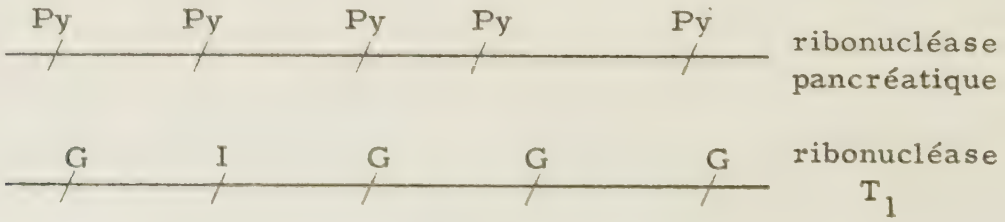
CHAPITRE V

APPLICATION DES REACTIONS DE METHYLATION ET D'ALLYLATION A LA DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES : Etude de l'action de la ribonucléase T_1 sur les acides ribonucléiques alcoylés.

INTRODUCTION

- PRINCIPES GENERAUX DE LA DETERMINATION DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES

La détermination des séquences repose sur le principe suivant : par action d'une endonucléase, on hydrolyse le RNA en oligonucléotides dont la stucture est déterminée ultérieurement. Pour établir l'ordre de ces oligonucléotides dans la chaîne polynucléotidique, on aura recours à une endonucléase de spécificité différente et provoquant des coupures à d'autres niveaux. La comparaison de la structure des oligonucléotides obtenus par action des deux types d'endonucléases, permet de reconnaître des recouvrements de séquences qui rendront possible la reconstitution de la séquence totale de la chaîne. C'est ainsi que la ribonucléase pancréatique donnera des oligonucléotides se terminant tous par des nucléotides pyrimidiques (Up, Cp, Tp, ψp) tandis que la ribonucléase T_1 coupera la chaîne polynucléotidique au niveau de G et de I



Il arrive cependant que cette technique ne soit pas suffisante pour permettre l'établissement des séquences. Il peut être nécessaire d'avoir des fragments plus longs que ceux donnés par les endonucléases classiques. Un des moyens employés pour obtenir ce résultat est de faire agir les nucléases dans des conditions non-optimales. Par exemple, l'action de la ribonucléase T_1 pendant des temps très courts et à basse température permet de limiter l'hydrolyse à un endroit de la chaîne du $tRNA^{Ala}$ (PENSWICK et HOLLEY, 1965) et du $tRNA^{Val}$ (MIRZABEKOV et coll., 1967).

Un autre moyen est d'empêcher l'action de l'endonucléase en réalisant une modification chimique au niveau d'un certain nombre de bases de manière que l'enzyme ne les reconnaisse plus, entraînant ainsi une absence d'hydrolyse au niveau de la liaison phosphodiester adjacente au nucléotide correspondant.

$$G^* \quad G^* \quad G \quad G^* \quad G^* \qquad \text{ribonucléase } T_1$$

G^* = guanine modifiée

La première modification proposée dans ce but a été l'action de l'hydroxylamine qui, selon le pH, modifie U ou C en rendant impossible l'action de la ribonucléase pancréatique au niveau des bases modifiées (VERWOERD et ZILLIG, 1963).

Des modifications de la guanine permettent aussi de limiter l'hydrolyse du RNA par la ribonucléase T_1. Ainsi, après modification quantitative de la guanine par le glyoxal, KOCHETKOV et coll. (1967) ont réalisé l'hydrolyse du $tRNA^{Val}$ spécifiquement au niveau de l'inosine et de la 2-diméthylamino-6-oxopurine avec la ribonucléase T_1.

Au moment où nous avons commencé notre travail, l'emploi de réactions d'alcoylation n'avait pas encore été envisagé dans ce

but, étant donné que l'on ne disposait que de données très fragmentaires sur l'influence de la méthylation sur l'action des endonucléases. On possèdait quelques renseignements concernant l'influence de la méthylation sur l'hydrolyse par la ribonucléase pancréatique. Il avait été montré par SZER et SHUGAR (1961) et par BRIMACOMBE et coll. (1965) que les esters des 3-méthyluridine-3'-phosphate et 3-méthylcytidine-3'-phosphate n'étaient pas hydrolysés par la ribonucléase pancréatique.

Les informations concernant la ribonucléase T_1 étaient beaucoup plus partielles. C'est l'étude de l'influence de l'alcoylation en N_7 de la guanine sur l'action de cet enzyme qui fera l'objet de ce chapitre.

-GENERALITES SUR LA RIBONUCLEASE T_1

Rappelons que la ribonucléase T_1, isolée de Aspergillus orizae par SATO et EGAMI (1957) fait partie du système enzymatique appelé Takadiastase. Ce système contient deux ribonucléases dites T_1 et T_2 qui diffèrent par leur pH optimum, leur point isoélectrique et la spécificité de substrat (pour la ribonucléase T_2, voir UCHIDA et EGAMI, 1967). Ces enzymes ont fait l'objet de travaux approfondis, en particulier de SATO-ASANO et EGAMI (1958, 1960) et de TAKAHASHI (1961).

La ribonucléase T_1 coupe les liaisons internucléotidiques entre la guanosine 3'-phosphate et les autres nucléotides par l'intermédiaire d'un dérivé cyclique 2',3'-phosphate qui est lui-même hydrolysé en 3'-phosphate. C'est une ribonucléate guanine nucléotido-2'-transférase, classée EC 2. 7. 7. 26. Dès 1959, SATO-ASANO et FUJII ont établi qu'elle rompt également les chaînes polyribonucléiques après l'inosine. Selon les conditions d'hydrolyse, on obtient le dérivé 2',3'-phosphate cyclique ou le nucléoside 3'-phosphate (ZACHAU, DÜTTING et FELDMANN, 1966 b ; HOLLEY et coll., 1965 b ; DÜTTING et ZACHAU, 1964).

- OBJET DU TRAVAIL

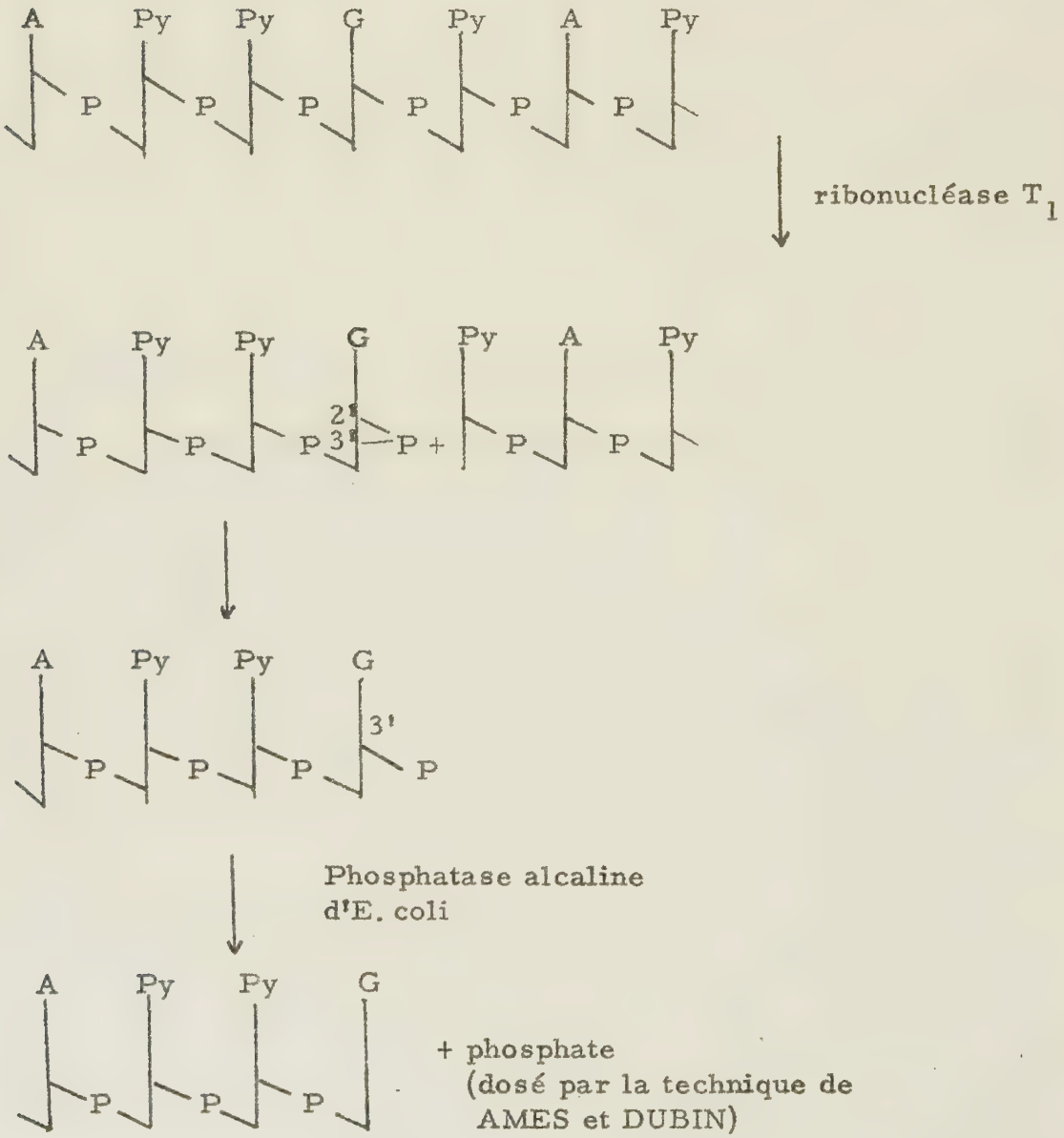
Le but de notre travail a consisté à étudier l'effet de l'alcoylation de la guanine sur l'action de la ribonucléase T_1. Il avait déjà été signalé que la présence de certains dérivés méthylés naturels de G et de I, dans les RNA, empêchait l'action de la ribonucléase T_1 à leur niveau.

C'est ainsi que Mc CULLY et CANTONI (1961) ont observé que les positions 1, 2 et 6 de la guanine doivent être libres de tout substituant pour que l'hydrolyse soit possible. Cependant, d'autres auteurs ont remarqué que la coupure de la liaison phosphodiester après certains types de guanine méthylée était réalisable. Ainsi, l'action de la ribonucléase T_1 conduit au niveau de N_2-diméthyl-GpX à un dérivé cyclique qui ne s'hydrolyse que très lentement (STAEHELIN, 1964 ; HOLLEY et coll., 1965 b ; MADISON et KUNG, 1967). Au niveau de la 1-méthylguanine, l'action de l'enzyme est particulièrement difficile et l'on n'obtient, là aussi, qu'un dérivé cyclique (STAEHELIN, 1964 ; HOLLEY et coll., 1965 b). La même observation a été faite pour la 1-méthylinosine (HOLLEY et coll., 1965 b). En présence de N_2-méthylguanine, la ribonucléase T_1 conduit selon certains auteurs au nucléoside 3'-phosphate (STAEHELIN, 1964 ; MADISON et KUNG, 1967). De plus, aucune hydrolyse n'est observée lorsque la guanosine est méthylée en position 2' sur le ribose (RAJBHANDARY et coll., 1966).

On remarquera que, dans ces travaux, aucune mention n'est faite de l'effet de l'alcoylation en N_7 de la guanine sur l'activité de l'enzyme. C'est cette étude que nous avons entreprise. Nous avons d'abord recherché si l'enzyme provoquait l'hydrolyse en dérivés 3'-phosphates des dinucléosides-phosphates du type GpX (X = A, G, U, C) après alcoylation de G en N_7. Cette hydrolyse a été contrôlée par dosage du phosphate libéré par action de la phosphatase alcaline d'E. coli sur les

Schéma 3

PRINCIPE DE LA METHODE DE DETERMINATION DE L'ACTION DE LA RIBONUCLEASE T_1



échantillons déjà traités par la ribonucléase T_1 (voir schéma 3). La même méthode a ensuite été appliquée aux tRNA méthylés ou allylés. Des méthodes complémentaires ont été utilisées pour rechercher la présence de dérivés cycliques éventuellement formés.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. PRODUITS EMPLOYES

- guanylyl-(3'-5'-)nucléosides (GpA, GpG, GpC, GpU) (WALDHOF, Mannheim).
- sRNA de levure de boulangerie ou de bière (BOEHRINGER , Mannheim).
- ribonucléase T_1 (SANKYO, Tokyo).
- phosphatase alcaline d'E. coli (WORTHINGTON, Freehold, N.J.).

II. MODIFICATIONS CHIMIQUES

Les alcoylations ont été effectuées par les techniques décrites dans la deuxième partie : méthylation par le sulfate de méthyle dans l'acétate de potassium 0,4 M, allylation par le bromure d'allyle en milieu diméthylformamide.

III. METHODES ANALYTIQUES

Les analyses ont été effectuées par chromatographie sur papier (chapitre II) après hydrolyse chlorhydrique dans le cas des dinucléosides-phosphates (chapitre IV) ou perchlorique pour les tRNA (chapitre II).

La méthode de AMES et DUBIN (chapitre II) a été utilisée pour doser soit le phosphore total, soit le phosphore libéré sous forme d'orthophosphate par la phosphomonoestérase (voir schéma 3). Dans ce dernier cas, on a évité l'étape de minéralisation par $Mg(NO_3)_2$ et la solution a été amenée, avec HCl 0,5 N, à un volume identique à celui des autres échantillons ; le dosage colorimétrique a alors été effectué sans chauffage préalable. Dans le cas des tRNA, ceux-ci ont été précipités avant le dosage par l'acide trichloracétique.

IV. MISE AU POINT DES CONDITIONS EXPERIMENTALES D'HYDROLYSE ENZYMATIQUE

1) Action de la phosphatase alcaline d'E. coli

L'efficacité de l'enzyme a été vérifiée sur les mono- et dinucléotides. Les résultats rassemblés dans le tableau XVIII indiquent que la libération du phosphate des phosphomonoesters est totale, aussi bien après 18 heures à 37° qu'après 30 minutes à 60°. Remarquons que nous avons choisi comme pH du milieu réactionnel le pH optimum de la ribonucléase T_1 (pH 7,5) et non celui de la phosphatase alcaline.

Sur ce tableau, nous constatons également l'absence d'activité phosphodiestérasique de notre préparation. Les phosphodiesters, cycliques ou non, ne libèrent pas de phosphate en présence de phosphatase alcaline. Nous avons contrôlé, par chromatographie en couche mince dans les conditions de REMY, DIRHEIMER et EBEL (1967), que la quantité de phosphore libéré à partir du cytidine 2',3'-phosphate cyclique provenait de la présence, dans l'échantillon utilisé, de traces de nucléoside-monophosphate.

Tableau XVIII

ACTION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE D'E. COLI SUR DIVERS MONO- ET DI-NUCLEOSIDES PHOSPHATES

	Conditions expérimentales	Adénosine 2'(3') P	Cytidine 5'-P	Adénosine 3',5'-P (cyclique)	Cytidine 2',3'-P (cyclique)	CpU	GpC
a = Ptotal exprimé en D. O. à 820mμ *		0,365	0,275	0,441	0,465	0,232	0,301
b = P libéré par la phosphatase en D. O. à 820 mμ	1	0,361	0,280	0,001	0,040	0	0
	2	0,361	0,274	0	0,022		
$\frac{b}{a}$ x 100	1	98,9	101,8	0,2	8,6	0	0
	2	98,9	99,6	0	4,7		

* Les D. O. sont exprimées après déduction des valeurs obtenues sur des témoins dans lesquels la solution de nucléotide est remplacée par de l'eau distillée.

Milieu réactionnel : solution de nucléotide (environ 3 mg/ml) 200 μl
tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,5) 250 μl
phosphatase alcaline d'E. coli (0,1 mg/ml) 10 μl

Incubation : (1) 18 heures à 37°
(2) 30 minutes à 60°.

Il faut cependant signaler que des rRNA, incubés avec la phosphatase, ont conduit à des profils différents après centrifugation en gradient de saccharose, selon que la durée d'incubation a été de 18 heures (à 37°) ou de 30 minutes (à 60°). Les diagrammes de sédimentation, excellents pour les rRNA chauffés 30 minutes à 60° en présence ou non de phosphomonoestérase, montrent une dégradation importante au bout de 18 heures à 37°. Mais, comme le RNA témoin, sans addition d'enzyme, donne un résultat similaire, on ne peut interpréter ces ruptures de chaîne comme étant dues à l'enzyme.

2) Action conjuguée de la ribonucléase T_1 et de la phosphatase alcaline d'E. coli

Deux techniques de digestion enzymatique, dérivant de méthodes décrites par différents auteurs, ont conduit à des résultats identiques.

- Technique 1 : Action simultanée de la ribonucléase T_1 et de la phosphomonoestérase

Cette technique est très voisine de celle décrite par Mc CULLY et CANTONI (1961). Nous l'avons appliquée aux travaux concernant les dinucléosides-phosphates et le tRNA de levure de bière, soumis ou non à l'allylation.

Milieu réactionnel :

dinucléoside-phosphate ou tRNA (solution à 2-3 mg/ml)	200 µl
tampon Tris-HCl 0,05 M (pH 7,5)	250 µl
ribonucléase T_1 (solution à 5 000 U/ml)	20 µl
phosphate alcaline d'E. coli (à 0,1 mg/ml)	10 µl

Incubation : 18 heures à 37°

Nous avons vérifié que la quantité de ribonucléase T_1 (100 unités pour 0,5 mg de matériel nucléique) provoque une hydrolyse totale des liaisons GpX. Des résultats identiques ont en effet été obtenus avec 50 ou 200 unités d'enzyme pour 0,5 mg de substrat.

Le phosphate libéré par les dinucléosides-phosphates a été dosé directement sur la solution. Les tRNA ont été au préalable additionnés de 40 µl d'acide trichloracétique à 100 p. 100. Le mélange a été abandonné 15 minutes à 0° pour précipiter les oligonucléotides acido-insolubles. Après centrifugation, le dosage a été effectué sur des aliquotes de 50 µl de surnageant.

Technique 2 : Action consécutive de la ribonucléase T_1 et de la phosphatase.

Cette technique apporte quelques modifications aux conditions décrites par DÜTTING et ZACHAU (1964) et MADISON et KUNG (1967). Elle a été appliquée à l'étude du tRNA de levure de boulangerie allylé, méthylé ou non modifié. La première étape est une hydrolyse par la ribonucléase T_1.

Milieu réactionnel :

Première étape

tRNA	environ 0,5 mg, soit	200 µl
tampon Tris-HCl	0,05 M (pH 7,5)	250 µl
ribonucléase T_1	(solution à 5 000 U/ml)	20 µl

Incubation : 18 heures à 37°

Deuxième étape : Addition à la solution précédente de 10 µl de phosphatase alcaline d'E. coli (à 0,1 mg/ml).

Le mélange a été porté 30 minutes au bain-marie à 60°. Le dosage du phosphore libéré a été effectué comme précédemment.

IV. RESULTATS

1) Influence de l'allylation de la guanine sur l'activité de la ribonucléase T_1

a - Action de la ribonucléase T_1 sur les guanylyl-(3'-5'-)nucléosides en fonction du taux d'allylation de la guanine

Les résultats dûs à l'action simultanée de la ribonucléase T_1 et de la phosphatase sont rassemblés dans le tableau XIX qui fait apparaître immédiatement une très forte diminution du phosphate libéré dans les dinucléosides-phosphates allylés par rapport aux témoins. On peut noter que les pourcentages d'allylation de la guanine et ceux de phosphate non libéré par action enzymatique sont remarquablement voisins et, dans certains cas, même identiques.

Les résultats précédents n'excluent cependant pas entièrement la possibilité d'une coupure de la liaison allyl GpX sous l'influence de la ribonucléase T_1. En effet, l'action de l'enzyme pourrait se limiter à la rupture des liaisons avec formation de phosphodiesters 2',3'-cycliques, dont l'hydrolyse ultérieure en 3'-phosphates serait éventuellement inhibée par suite de l'alcoylation de la guanine. Comme nous l'avons vérifié (tableau XVIII), ces dérivés ne sont pas hydrolysés par la phosphatase.

Pour éliminer cette incertitude, les solutions de guanylyl-(3'-5')nucléosides allylés et soumis à l'hydrolyse par la ribonucléase T_1 et la phosphatase alcaline ont été analysées à l'aide de différentes méthodes chromatographiques classiques (filtration sur colonne de Sephadex G 10, chromatographie bidimensionnelle sur papier, chromatographie monodimensionnelle sur couche mince avec différents solvants).

Tableau XIX

COMPARAISON ENTRE LE POURCENTAGE D'ALLYLATION DE LA GUANINE ET LA DIMINUTION DE L'ORTHOPHOSPHATE LIBERE PAR LA RIBONUCLEASE T_1 ET LA PHOSPHATASE ALCALINE D'E. COLI DANS LES GUANYLYL (3'-5')-NUCLEOSIDES.

Substrat	GpA		GpG		GpC		GpU	
	témoin	allylé	témoin	allylé	témoin	allylé	témoin	allylé
P total = P_1 (D. O. à 820 mμ)	0,322	0,354	0,245	0,200	0,301	0,276	0,236	0,342
P libéré par action enzymatique = P_2 (D. O. à 820 mμ)	0,302	0,090	0,222	0,024	0,301	0,033	0,232	0,042
Pourcentages de phosphate libéré par action enzymatique = $\frac{P_2}{P_1}$ 100	93,8	25,4	94,6	12	100	11,8	98,3	12,3
Pourcentage de phosphate non libéré par action enzymatique = 100- $\frac{P_2}{P_1}$ 100	6,2	74,6	5,4	88	0	88,2	1,7	87,7
Pourcentage d'allylation de la guanine (analyse chromatographique)		74,1		90		87,5		87,7

Nous avons toujours vérifié que les composés GpX témoins étaient totalement hydrolysés, dans les mêmes conditions. Dans le cas des guanylyl-nucléosides allylés, nous avons régulièrement pu mettre en évidence l'allylguanylyl-nucléoside non hydrolysé, reconnaissable par sa position chromatographique et par sa fluorescence bleue en lumière ultraviolette. Cette fluorescence est caractéristique des dérivés guanyliques N_7-alcoylés. Nous n'avons jamais décelé la présence d'un deuxième composé fluorescent susceptible de correspondre au 7-allylguanosine-2',3'-phosphate cyclique. Il en résulte que l'allylation en N_7 de la guanine a bien inhibé l'hydrolyse de la liaison phosphodiester par la ribonucléase T_1.

b - Action de la ribonucléase T_1 sur le tRNA en fonction de l'allylation de la guanine

Les résultats obtenus avec les tRNA allylés sont résumés dans le tableau XX. Ils sont exprimés en nombre de phosphores libérés par l'action combinée de la ribonucléase T_1 et de la phosphatase alcaline pour une chaîne de tRNA. Nous avons adopté pour le tRNA un P. M. de 27000 correspondant à 75 nucléotides environ (LINDAHL, HENLEY et FRESCO, 1965). Ces valeurs tiennent compte des contaminations par les phosphates libérés par les polyphosphates inorganiques. Ce phosphore polyphosphorique a été déterminé par dosage de l'orthophosphate libéré par action de la phosphatase alcaline d'E. coli sur le tRNA. Il a, en effet, été montré que cet enzyme hydrolyse les polyphosphates (HEPPEL, HARKNESS et HILMOE, 1962).

Il ressort nettement des valeurs trouvées que la diminution du nombre de phosphates libérés par la double action de la ribonucléase T_1 et de la phosphatase alcaline, après allylation du tRNA, est liée à la modification en N_7 de la guanine dans le polyribonucléotide.

Tableau XX

COMPARAISON ENTRE LE POURCENTAGE D'ALLYLATION DE LA GUANINE ET LA DIMINUTION DU NOMBRE D'ORTHOPHOSPHATES LIBERES PAR ACTION DE LA RIBONUCLEASE T_1 ET DE LA PHOSPHATASE ALCALINE D'E. COLI

Substrat		Conditions d'expérience		Nombre de P libérés par chaîne *	Pourcentage d'alcoylation **	
					enzymatique	chromatographique
tRNA de levure de bière	témoin	Technique	1	24,2	16,1	14,0
	allylé	"	1	20,3		
tRNA de levure de boulangerie I	témoin	"	2	23	13,0	13,2
	allylé	"	2	20		

* Ces valeurs tiennent compte de contaminations par le phosphore des polyphosphates inorganiques qui a été déduit.

** - Pourcentage enzymatique : diminution, en pourcentage, du phosphate libéré dans le tRNA allylé par rapport au tRNA témoin.

- Pourcentage chromatographique : pourcentage de G allylé, déterminé par chromatographie, par rapport à G total.

Tableau XXI

COMPARAISON ENTRE LE POURCENTAGE DE GUANINE METHYLEE ET LA DIMINUTION DU NOMBRE D'ORTHOPHOSPHATE LIBERES PAR CHAINE DE tRNA SOUS L'ACTION DE LA RIBONUCLEASE T_1 ET DE LA PHOSPHATASE ALCALINE D'E. COLI

Substrat		Nombre de P libérés par chaîne *	Pourcentages de méthylation **	
			enzymatique	chromatographique
tRNA II	témoin	23,9	0	0
tRNA	méthylé (a)	20,4	15,1	14,0
tRNA	méthylé (b)	18,5	22,5	20,9

* Ces valeurs tiennent compte des contaminations par le phosphore des polyphosphates inorganiques qui a été déduit.

** Pourcentages : cf. tableau XX.

Conditions expérimentales : - tRNA de levure de boulangerie
- technique d'hydrolyse n°2

c - Influence de la méthylation de la guanine sur l'activité de la ribonucléase T_1

Dans le cas de la méthylation, modification moins spécifique que l'allylation puisqu'elle affecte l'adénine et la cytosine en plus de la guanine, nous n'avons effectué qu'une étude de confirmation directement sur le tRNA. Les résultats sont consignés dans le tableau XXI. Là aussi, on observe après méthylation une diminution du nombre de phosphates libérés par la double action de la ribonucléase T_1 et de la phosphatase alcaline montrant que la méthylation en N_7 de la guanine a empêché l'action de la ribonucléase T_1.

DISCUSSION

Les résultats précédents permettent de conclure que la ribonucléase T_1 est sans action au niveau des résidus N_7-alcoylguanyliques. Quelques travaux plus récents sont venus confirmer ce résultat. REESE et SULSTON (1967) ont démontré que la ribonucléase T_1 n'hydrolyse pas la liaison phosphodiester dans le dinucléoside-phosphate 7-méthyl GpU, ce qui est en accord avec notre résultat. Notre travail permet d'étendre cette observation aux autres dinucléosides-phosphates du type 7-méthyl GpX et aux dinucléosides-phosphates du type 7-allyl GpX. Par ailleurs, nous avons montré que ces conclusions sont applicables aux tRNA allylés ou méthylés. Les résultats de l'hydrolyse du $tRNA^{Phe}$ de levure par la ribonucléase T_1 ont montré qu'il se formait un oligonucléotide de composition 7-MeGpUpCpMeCpUpGp (RAJBHANDARY et coll., 1967). Le fait qu'il n'y ait pas eu de coupure à côté de 7-méthyl G confirme l'inhibition de la ribonucléase T_1 sous l'influence de la méthylation en N_7 de la guanine.

L'intérêt de ces résultats peut être envisagé sous deux angles. En premier lieu, étant donné le parallélisme entre la diminution de l'hydrolyse des liaisons phosphodiesters par la ribonucléase T_1 et le taux d'alcoylation de la guanine dans les RNA chimiquement alcoylés, la méthode d'action conjuguée de cet enzyme et de la phosphatase alcaline d'E. coli pourrait être utilisée pour déterminer le taux de 7-alcoylguanine formée au cours des réactions d'alcoylation. Cette méthode présenterait d'avantage de ne nécessiter qu'une faible quantité de matériel nucléique et d'être rapide, mais elle exige un soin tout particulier.

Mais, l'application la plus intéressante pourrait résider dans l'analyse des séquences nucléotidiques dans les RNA, dans lesquels l'alcoylation en N_7 de la guanine permet d'obtenir, après action de la ribonucléase T_1, des fragments plus longs.

Notre travail avait déjà été réalisé (BOLLACK et EBEL, 1968) lorsque BROWNLEE, SANGER et BARRELL (1968) ont publié la détermination de la séquence du RNA 5S d'E. coli. Ces auteurs ont employé la technique de méthylation pour obtenir des fragments plus longs par digestion avec la ribonucléase T_1. Mais, ils font remarquer eux-mêmes qu'ils ont été gênés par le fait que d'autres bases que la guanine sont susceptibles d'être touchées par la méthylation, ce qui modifiait le comportement électrophorétique ou chromatographique des oligonucléotides libérés par hydrolyse. Dans le cas de l'allylation, cet inconvénient serait écarté puisque cette réaction est spécifique de la guanine, de sorte que l'interprétation des résultats en serait facilitée.

CHAPITRE VI

APPLICATION DE LA REACTION DE METHYLATION A LA DETERMINATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE ET TERTIAIRE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES DE TRANSFERT :

Détermination des sites accessibles à la méthylation dans le $tRNA^{Phe}$ de levure.

INTRODUCTION

Une deuxième application intéressante des modifications chimiques concerne l'établissement de la structure secondaire et tertiaire des RNA. Cette étude est particulièrement importante dans le cas des RNA de transfert, dont on sait qu'ils possèdent une conformation dans l'espace très précise, nécessaire à leur activité biologique. Un des problèmes fondamentaux de la Biologie moléculaire est justement d'exprimer les fonctions en termes de structure.

Il est reconnu que les tRNA comprennent des zones en simple brin et d'autres zones en double hélice, celles-ci étant mises en évidence par l'hyperchromicité observée au cours de la dénaturation thermique. Parmi différents modèles, le plus populaire est le modèle en "feuille de trèfle" proposé par HOLLEY et coll. (1965 a) pour le $tRNA^{Ala}$. Cette structure peut s'adapter à tous les tRNA dont la séquence est déjà déterminée. Elle a l'avantage de mettre en évidence, chez les divers tRNA, l'existence de zones en simple brin formant des boucles et présentant des analogies de structure et une localisation comparable (pour une revue de la question, voir EBEL - 1968). Nous indiquerons ici comment se présente, dans cette hypothèse, la structure du $tRNA^{Phe}$ qui nous intéressera plus particulièrement telle que l'ont déterminée RAJBHANDARY et coll. (1967) (voir figure 21).

Le modèle en feuille de trèfle laisse prévoir des régions plus ou moins accessibles dont l'existence a été confirmée à l'aide de divers agents de modifications. La réalité de telles régions a d'abord été mise en évidence par des observations indiquant que les possibilités d'hydrolyse enzymatique par des endo- ou exonucléases dépendent de la configuration des tRNA (voir MIURA, 1967).

L'emploi des modifications chimiques a également permis d'obtenir des informations sur l'existence d'une structure secondaire et probablement tertiaire des tRNA.

La première approche utilisée dans ce but a été l'action du formaldéhyde. Ce réactif forme des bases de Schiff avec les groupes $-NH_2$ libres. MARCIELLO et ZUBAY (1964) ont étudié l'addition de formaldéhyde ^{14}C sur le tRNA d'E. coli en fonction de la température et de la durée de réaction. Ils ont observé que les restes nucléotidiques se divisent en trois groupes : l'un qui réagit rapidement (à 10°) pourrait correspondre aux régions en simple brin ; le deuxième (qui réagit entre 10 et 26°) et le troisième (touché à 37°) proviendraient de régions présentant une structure secondaire et tertiaire plus ou moins stable. Cependant, l'instabilité de la fixation du formaldéhyde sur les groupements aminés limite cette méthode.

D'autre part, CRAMER et ses collaborateurs (SEIDEL et CRAMER, 1965 ; DOEPNER, SEIDEL et CRAMER, 1966 a et b ; CRAMER, 1967) ont employé l'oxydation par l'acide monoperphtalique pour obtenir quelques renseignements sur la structure secondaire des tRNA. Ils ont décrit l'effet de ce réactif comme transformant A et C en N-oxydes. Mais, des travaux récents de GANGLOFF, dans notre laboratoire (GANGLOFF et EBEL, 1968), ont montré qu'il se produit également une dégradation de la guanine. SEIDEL et CRAMER (1965) ont observé que l'oxydation de A est fortement diminuée dans le complexe poly A - poly U et dans le

DNA indiquant que A n'est pas oxydé quand il est engagé dans une double hélice. DOEPNER, SEIDEL et CRAMER (1966 b) ont alors pu calculer que, dans le $tRNA^{Ser}$ de levure, sur 28 paires de bases, 6 deviennent accessibles à l'acide monoperphtalique entre 20 et 40°. Ce démasquage de 6 paires de bases est interprété comme résultat de l'existence d'une structure tertiaire.

Effectivement, les travaux de FRESCO et coll. (1966) et de SUEOKA, TAMAKO-SUEOKA et GARTLAND (1966) ont montré que la représentation plane du modèle en feuille de trèfle ne répond pas à toutes les propriétés des tRNA et qu'il faut faire appel à une structure tridimensionnelle plus complexe. Ces auteurs ont mis en évidence deux états conformationnels réversibles, l'un natif et biologiquement actif, l'autre dénaturé et inactif, chez divers tRNA (levure et E. coli respectivement). La forme dénaturée est la plus sensible à l'attaque par la ribonucléase pancréatique (ADAMS, LINDAHL et FRESCO, 1967) et par la polynucléotide phosphorylase (THANG et coll., 1967). L'inacessibilité à l'oxydation par le periodate des résidus 4-thiouracile dans le tRNA d'E. coli, sous sa forme native, confirme la protection de cetaines régions sous l'influence de la structure tertiaire (ZIFF et FRESCO, 1967). De leur côté, ADAMS, LINDAHL et FRESCO (1967) ont mis en évidence deux formes de $tRNA_3^{Leu}$ possédant des structures secondaires identiques et dont l'une est inactive ; le tRNA inactif peut être "renaturé" par chauffage en présence d'une concentration suffisante en Mg^{++} (5 minutes à 60° ; Mg^{++} 0,005 - 0,02 M). Les travaux de BRAHMS (1968) tendent également à montrer l'existence d'une structure tertiaire des tRNA, décelable au cours de l'étude de la dénaturation thermique par le dichroïsme circulaire (voir aussi pour $tRNA^{Phe}$, BAKES, DIRHEIMER et BRAHMS, 1968). La connaissance de cette structure tridimensionnelle est capitale pour la compréhension des fonctions des tRNA. Sa détermination est très difficile. Ce n'est que tout récemment que la cristallisation

du formyl-méthionine tRNA ($tRNA_F^{Met}$) a été réussie (CLARK et coll., 1968), rendant ainsi possible une étude de diffraction des rayons X.

Des modèles de structure tertiaire ont été proposés par CRAMER (1967) et par LAKE et BEEMAN (1968). Ces modèles ont en commun un repliement des deux bras latéraux de la feuille de trèfle de façon à apparier Ψ et C dans la séquence TpΨpCpGp avec une séquence ApGp de la région riche en dihydrouracile. Le triplet terminal pCpCpA serait lui aussi apparié, mais à une séquence différente selon les auteurs. Cette participation du triplet pCpCpA à la structure tertiaire des tRNA est suggérée par les modifications du profil de dispersion optique rotatoire (SARIN et ZAMECNIK, 1965 ; STULBERG et ISHAM, 1967) et des propriétés de sédimentation (KAJI et TANAKA, 1967) observées après enlèvement, oxydation ou aminoacylation de l'adénosine terminale.

Objet du travail :

Nous nous sommes proposés d'étudier la localisation des sites accessibles à une modification chimique dans un tRNA spécifique, le $tRNA^{Phe}$. Comme modification, nous avons choisi la méthylation par le sulfate de méthyle en milieu acétate de potassium 0,4 M, en présence d'ions Mg^{++} pour stabiliser la structure secondaire. Comme tRNA, nous avons utilisé le $tRNA^{Phe}$. A la suite des travaux de différents auteurs avec d'autres modifications chimiques, on pouvait escompter que la méthylation se produise en premier lieu dans les zones les plus accessibles c'est-à-dire les zones en simple brin. Il suffisait ensuite d'hydrolyser les tRNA méthylés par action d'une ribonucléase, la ribonucléase T_1. Mais nous avons vu que l'action de cet enzyme est inhibée au niveau des résidus 7-méthylguanyliques, de sorte que l'atteinte d'un G doit provoquer la formation d'oligonucléotides plus longs, concomittante à la disparition des pics initiaux. Nous avons tenté cette approche et, pour rendre plus aisée la recherche des oligonucléotides

formés, nous avons employé du sulfate de méthyle radioactif. La séparation des oligonucléotides a été effectuée sur colonne de DEAE-cellulose (échangeur d'anions) en présence d'urée selon la méthode de TOMLINSON et TENER (1962, 1963).

I. TECHNIQUES EXPERIMENTALES

1) Produits employés

- $tRNA^{Phe}$: le $tRNA^{Phe}$ a été obtenu par fractionnement, par distribution en contre-courant, du sRNA de levure de bière (BOEHRINGER, Mannheim) dans les conditions décrites au chapitre I.

- Sulfate de méthyle : PROLABO

- Sulfate de méthyle radioactif : Nous avons utilisé du sulfate de méthyle provenant de RADIOCHEMICAL CENTER (AMERSHAM, Grande-Bretagne) marqué sur $-CH_3$ par ^3H (5mC/ml ; solution benzénique à 167 mC/mmole) ou par ^{14}C (22, 7 mC/mmole ; pur).

2) Technique de méthylation par le sulfate de méthyle radioactif

La méthylation a été effectuée en milieu acétate de potassium 0, 4 M et, dans les conditions standard, de $MgCl_2$ 0, 02 M ; la concentration de $tRNA^{Phe}$ dans le milieu réactionnel était d'environ 1 mg/ml. Le sulfate de méthyle radioactif (0, 5 à 1 mC pour 20 mg de tRNA) est dilué avec du sulfate de méthyle non radioactif avant l'addition de la solution de tRNA. Les conditions d'incubation seront précisées dans le texte. Dans le cas du sulfate de méthyle tritié, fourni en solution benzénique, le milieu a été soumis à une agitation intermittente dans l'appareil WHIRLIMIXER.

Après méthylation, le tRNA a été récupéré selon la technique habituelle : précipitation par 2 volumes d'éthanol à 2 p. 100 d'acétate de potassium, 2 lavages par le mélange éthanol-NaCl 0,1 M (2 : 1 v/v), dissolution dans NaCl 10^{-3} M, dialyse contre H_2O. La radioactivité fixée a été mesurée sur 15 µl de la solution de tRNA en présence de 5 ml de mélange scintillateur à base de BBOT (voir chapitre VII) à l'aide du compteur à scintillation TRICARB PACKARD.

3) Analyse du tRNA méthylé

L'analyse des bases n'a pu être effectuée par hydrolyse perchlorique, cette méthode exigeant trop de matériel nucléique. Une hydrolyse chlorhydrique a été pratiquée avec HCl N 1 heure à 100° (MARKHAM et SMITH, 1951). La chromatographie de l'hydrolysat a été effectuée sur papier selon la technique décrite dans le chapite II, ou sur plaque de cellulose (SCHLEICHER et SCHULL, n°1440) avec le même système de solvants (dans ce cas, durée de migration de 9 heures dans le sens I et de 6 heures dans le sens II). Les deux techniques conduisent au même résultat. On obtient les bases puriques et les nucléosides pyrimidiques, ces derniers ne migrant pas dans le deuxième solvant.

Après révélation en lumière UV, les taches ont été éluées et la densité optique mesurée au maximum d'absorption. La radioactivité a également été mesurée sur une aliquote de l'éluat.

4) Hydrolyse par la ribonucléase T_1

L'hydrolyse a été réalisée en milieu Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, en présence d'une goutte de chloroforme. La ribonucléase T_1 (SANKYO, Tokyo) a été utilisée à raison de 200 unités par mg de tRNA.

Après une incubation de deux heures à 37°, le milieu a été rendu 7 M en urée par addition d'urée cristallisée. Il est bon de vérifier que l'hydrolyse a bien eu lieu, en prenant la densité optique à 260 mμ avant et après action de l'enzyme (et avant l'addition d'urée) et en vérifiant que l'on trouve une hyperchromicité suffisante.

5) Chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose des oligonucléotides obtenus après action de la ribonucléase T_1

La séparation des oligonucléotides a été effectuée par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose dans les conditions décrites par RAJBHANDARY et coll. (1966).

a - Préparation de la DEAE-cellulose

40 g de DEAE-cellulose (DEAE-SN SERVA, capacité 0,45) sont mis en suspension dans deux litres d'eau désionisée dans une éprouvette de 2 litres. Après agitation suivie d'une décantation de 20 minutes, on prélève la phase supérieure de façon à éliminer la maximum de "fines" (on aspire environ 1,9 litre). La même opération est répétée encore 4 fois (mise en suspension dans deux litres d'eau, décantation, élimination du surnageant) avec des temps de repos de 10 minutes seulement. La suspension obtenue est lavée sur un grand verre fritté avec, successivement :

3 litres d'acide acétique 0,2 N (par portions de 300 ml)

2 litres d'eau désionisée (idem)

2 litres d'une solution aqueuse contenant la même concentration saline que celle du tampon de plus forte molarité utilisé pour l'élution (0,3 ou 0,5 M NaCl en général)

3 litres d'eau désionisée.

Il faut veiller à ne pas laisser la cellulose se dessécher et à ne pas créer de nouvelles particules fines par une agitation trop violente. La cellulose ainsi lavée est mise en suspension dans 800 ml d'eau ; elle peut être conservée à 4°.

b - Préparation de la colonne

La cellulose préparée à partir de 2 x 40 g de DEAE-cellulose initiale est équilibrée avec le tampon A (Tris-HCl pH 7,5 0,02 M - urée 7 M) puis coulée dans une colonne de 120 cm (hauteur utile : 110 cm) et de 1 cm de diamètre. Il est indispensable de filtrer préalablement la solution tampon sur une couche de laine de verre recouverte de DEAE-cellulose. Le débit de la colonne est de l'ordre de 60 à 70 ml/heure.

c - Elution de la colonne

La colonne est chargée avec la solution de tRNA hydrolysé par la ribonucléase T_1 et éluée à la température ambiante avec un gradient linéaire de concentration en NaCl de 0 à 0,3 ou 0,6 M, dans le tampon Tris-HCl pH 7,5 0,02 M (tampon A précédent). Les fractions sont recueillies à l'aide d'un collecteur de fractions GILSON GME muni d'un enregistreur de l'absorption à 254 mμ. Lorsque l'élution a été effectuée avec un gradient de 0 à 0,3 M NaCl, celui-ci a été suivi d'un gradient linéaire de concentration de 0,3 à 0,5 M NaCl dans le même tampon pour vérifier que l'élution avait été totale. Le volume de chaque tampon initial est de 1 ou 2 litres ; le gradient de 0,3 à 0,5 M NaCl est réalisé avec 200 ml de chaque tampon. Les fractions recueillies sont de l'ordre de 4 ml.

d - Détermination des résultats

Sur chaque fraction, on mesure la densité optique à 260 mμ et, si nécessaire, la radioactivité. Cette dernière est déterminée sur 0,4 ml de chaque fraction en présence de 13 ml de mélange scintillateur BBOT (voir chapitre VII) à l'aide du compteur à scintillation TRICARB PACKARD. Nous avons vérifié que la présence d'urée permet le comptage dans ces conditions, mais que le rendement est abaissé de 30 p. 100.

6) Analyse des fractions recueillies

Les fractions sont rassemblées par pics. Celles devant être analysées sont soumises à un dessalage destiné à éliminer l'urée et les sels qu'elles contiennent.

a - Dessalage

La technique décrite ici est une modification de la technique de RUSHIZKY et SOBER (1962). Elle a été mise au point dans notre laboratoire par J. GANGLOFF qui a employé le bicarbonate de triéthylammonium ou TEABC préconisé par STAEHELIN (1968). Le TEABC est plus facile à éliminer ultérieurement que le carbonate d'ammonium utilisé dans la méthode initiale.

La DEAE-cellulose (SCHLEICHER et SCHÜLL, n° 70, 0,9 meq/g) est préparée selon une technique analogue à celle décrite précédemment, mais les lavages ont été effectués successivement par HCl 0,2 N, par H_2O jusqu'à neutralité, par KOH 0,2 N, par H_2O jusqu'à neutralité, par l'urée 7 M - NaCl M, enfin par H_2O jusqu'à disparition des ions Cl^-.

Le bicarbonate de triéthylamine a été préparé de la façon suivante : 50 ml de triéthylamine (FLUKA) sont distillés (E = 88°), puis dilués avec 150 ml d'eau. On fait barboter CO_2 dans cette solution, dans un ballon surmonté d'un réfrigérant et placé dans un bain de glace, jusqu'à obtention d'une phase homogène de pH environ 8,2 (environ 18 heures). Le TEABC est titré par HCl N/10 en présence de rouge de méthyle ; au premier virage, il faut chauffer la prise d'essai pour éliminer le CO_2 dissous avant de terminer le dosage. A partir de cette solution, on prépare une solution de TEABC M et une autre 0,01 M.

Mode opératoire : On prépare une colonne de DEAE-cellulose (hauteur 3 cm ; diamètre 1 cm) et on maintient la cellulose avec une petite couche de billes de verre (billes de 45/50 de diamètre traitées par HCl concentré à l'ébullition et lavées à l'eau jusqu'à neutralité). Après lavage à l'eau distillée, la colonne est chargée avec les fractions à dessaler, préalablement diluées 5 fois avec H_2O, l'ensemble étant ajusté à pH 7,5 avec NH_4OH 1 p. 100.

On fait passer 500 ml d'eau distillée suivis de 5 ml de TEABC 0,01 M jusqu'à l'élimination totale des chlorures. On vérifie, en mesurant la densité optique ou la radioactivité, que les nucléotides n'ont pas été élués. L'élution est alors réalisée avec la solution de TEABC M (2 à 10 ml sont nécessaires selon la charge de l'oligonucléotide) en suivant la présence des nucléotides dans les fractions (par D.O. ou radioactivité).

Après addition d'eau, la solution obtenue est évaporée à sec à l'évaporateur rotatif BUCHI, à 37°. Une deuxième addition d'eau suivie d'évaporation est nécessaire pour éliminer totalement le TEABC.

b - Analyse des fractions dessalées

Nous avons effectué l'analyse des constituants par hydrolyse chlorhydrique (technique décrite plus haut) ou par hydrolyse

alcaline (en collaboration avec G. KEITH).

Dans le cas des fractions radioactives, nous avons effectué une hydrolyse chlorhydrique suivie d'une chromatographie monodimensionnelle sur papier dans le solvant II (voir chapitre II), en ajoutant comme repère un hydrolysat chlorhydrique de tRNA témoin non marqué. Le papier a été découpé en rectangles de 4,5 x 1,5 cm. La radioactivité de ces rectangles a été mesurée en présence de 5 ml de mélange scintillateur BBOT. Nous avons ainsi déterminé la nature et la radioactivrté des constituants marqués.

c - Recherche de dihydrouracile

Le dihydrouracile n'absorbe pas à 260 mμ. Sa recherche est basée sur l'ouverture du cycle en milieu alcalin. La fraction dessalée est soumise à une hydrolyse alcaline (KOH 0,3 N - 16 heures). Après chromatographie sur plaque de cellulose (1er solvant : propanol - NH_4OH - H_2O (60 : 30 : 10) ; 2ème solvant : isopropanol - HCl - eau (170 : 41 : 39)), on pulvérise une solution de p-diméthylaminobenzaldéhyde (1 g dissous dans 100 ml éthanol à 95° et 10 ml HCl concentré). Le dihydrouracile se révèle en jaune au bout d'un certain temps. Une plaque témoin permet de repérer l'emplacement du dihydrouracile et de ne pas le confondre avec d'autres dérivés donnant la même réaction, tels que l'urée.

Une autre méthode, rapide, est la mesure de minute en minute de la variation de la densité optique à 230 mμ après addition de KOH de façon à avoir une concentration 0,1 N. L'absorption à 230 mμ, due au diHU, décroît progressivement avec l'ouverture du cycle. L'hydrolyse alcaline se traduit, en effet, par une rupture de la liaison N_3-C_4 avec formation d'un dérivé de l'acide uréidopropionique

$$HOOC - CH_2 - CH_2 - \underset{1}{N} - CO - NH_2$$

II. RESULTATS

1) Influence de la concentration de Mg^{++} sur la méthylation du $tRNA^{Phe}$

Etant donné l'effet stabilisateur des ions Mg^{++} sur la conformation des tRNA, il nous a semblé intéressant d'étudier l'effet de concentrations croissantes de ces ions sur le taux de méthylation de $tRNA^{Phe}$. Le tableau XXII représente le pourcentage de $-CH_3$ (^3H) fixé en fonction de la concentration de Mg^{++}, la radioactivité fixée en l'absence de Mg^{++} étant considérée comme niveau de référence (100 p. 100).

Tableau XXII

VARIATION DU TAUX DE METHYLATION DE $tRNA^{Phe}$ EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN Mg^{++}

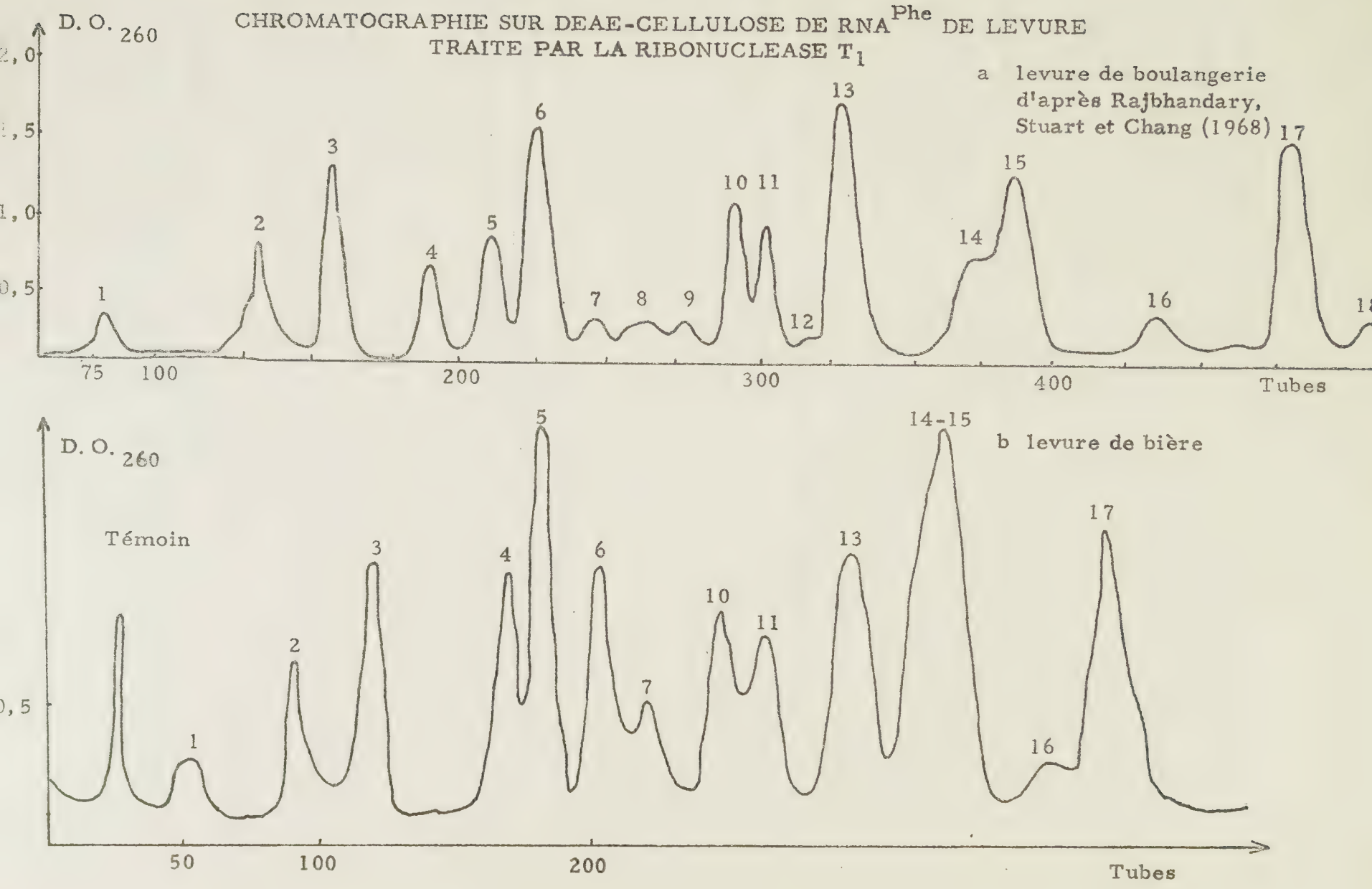
Concentration en Mg^{++}		0	10^{-3} M	10^{-2} M	$2 \cdot 10^{-2}$ M
$\frac{\text{CPM fixés}}{\text{CPM fixés par le témoin}} \times 100$	expérience 1	100	90,3	75,1	63,1
	expérience 2	100	95,1	79,3	64,9
	$-CH_3$ fixés	5	4,6	3,9	3,2

Conditions de la réaction : 1 h 30 à 20°.

Expérience 1 :
volume réactionnel : 1 ml - tRNA 0,76 mg - Me_2SO_4 : 5 µl - Me_2SO_4 (^3H) 20 µl

Expérience 2 :
volume réactionnel : 1 ml - tRNA 0,66 mg - Me_2SO_4 : 5 µl - Me_2SO_4 (^3H) 20 µl

Figure 20


D. O. 260
CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE DE RNA Phe DE LEVURE
TRAITE PAR LA RIBONUCLEASE T1
a levure de boulangerie
d'après Rajbhandary,
Stuart et Chang (1968)
2,0
1,5
1,0
0,5
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10 11
12
13
14
15
16
17
75
100
200
300
400
Tubes
D. O. 260
Témoin
b levure de bière
0,5
1
2
3
4
5
6
7
10
11
13
14-15
16
17
50
100
200
Tubes

On constate que l'addition de concentrations croissantes de Mg^{++} diminue la quantité de groupes $-CH_3$ fixés. En exprimant les résultats en nombre de $-CH_3$ fixés par mole de tRNA, on remarque qu'une méthylation effectuée dans des conditions qui permettent normalement de fixer 5 $-CH_3$ ne conduit plus qu'à l'addition de 3 $-CH_3$ en présence de Mg^{++} 0,02 M.

Ces résultats sont en accord avec ceux que viennent de publier ZAKHARYAN, VENKSTERN et BAEV (1967). En présence de $MgCl_2$ 0,01 M, ces auteurs constatent une inhibition de la méthylation de la guanine dont le taux de modification n'est plus que 50 à 55 p. 100 de celui obtenu en l'absence de Mg^{++}.

A la suite de cette étude, nous avons adopté la concentration de Mg^{++} 0,02 M qui nous a paru susceptible de fournir les renseignements les plus valables sur les régions accessibles de $tRNA^{Phe}$. Pour les faibles méthylations que nous avons réalisées, les courbes de fusion ne sont pas modifiées par rapport au tRNA témoin.

2) Comparaison du profil de fractionnement chromatographique des oligonucléotides obtenus par action de la ribonucléase T_1 sur les $tRNA^{Phe}$ de levure de boulangerie et de levure de bière

La figure 20 (a) reproduit le profil de fractionnement chromatographique du tRNA de levure de boulangerie selon RAJBHANDARY, STUART et CHANG (1968). Le profil (b), sur la même figure, représente celui que nous avons obtenu avec le $tRNA^{Phe}$ de levure de bière dans des conditions presque identiques.

On remarque immédiatement de nombreuses similitudes entre les deux courbes. Nous avons numéroté les pics de la courbe (b) de façon à mettre en évidence le rapprochement des deux profils. Les

pics 1, 2, 3, 10, 11, 13, 14-15, 16 et 17 ont une position tout à fait comparable. Par contre, on constate que trois pics diffèrent essentiellement : les pics 4, 5 et 6 ; le pic le plus important est le pic 6 dans le profil (a) et le pic 5 dans notre cas (b).

Le tableau XXIII indique les séquences des fragments contenus dans les pics obtenus par fractionnement de l'hydrolysat par la ribonucléase T_1 du $tRNA^{Phe}$, telles qu'elles ont été établies par RAJBHANDARY, STUART et CHANG (1968). L'examen des séquences montre que l'ordre d'élution des pics dépend d'un certain nombre de facteurs parmi lesquels le nombre de charges des groupements phosphoriques est déterminant. Un autre facteur est la présence de bases méthylées telles que la 7-méthylguanine, qui diminuent la charge négative et accélèrent l'élution de l'oligonucléotide correspondant.

Nous avons vérifié, en collaboration avec G. KEITH, la composition des fragments contenus dans certains des pics que nous avons obtenus dans le fractionnement du tRNA de levure de bière. Notre analyse s'est en particulier portée sur les pics 2, 10 et 13 qui renferment un certain nombre de bases mineures. Nous avons trouvé la même composition que celle des pics correspondants dans le profil de fractionnement de RAJBHANDARY, ce qui permet de penser que les pics qui ont la même position dans les deux profils sont identiques.

Il restait à expliquer la différence observée au niveau des pics 4, 5 et 6. Si nous regardons la composition de ces pics, nous voyons que le pic 4 (a) contient la séquence terminale pCpC qui correspond au triplet pCpCpA ayant perdu l'adénosine. Or, dans le tRNA de levure de bière, contrairement au tRNA de levure de boulangerie, l'adénosine terminale est présente. Si l'on tient compte de ce fait, au lieu de CpApCpC (qui migre comme un oligonucléotide à 3 charges), nous aurons

Tableau XXIII

a

tRNA^{Phe} de levure de boulangerie
(d'après RAJBHANDARY, STUART et CHANG (1968)

Pic	Composition	Rapport molaire *
1	Gp! **	0,9
2	CpdiMeGp !	1,1
3	Gp	4,0
4	CpApCpC	0,9
5	UpGp	1,0
	CpGp	1,0
6	ApGp	3,0
	Ap2MeGp	0,25
7	diHUpdiHUpGp	1,1
8	ApUpUpUp !	0,25
9	pGp	1,1
10	TpψpCpGp	1,2
11	CpCpApGp	1,0
12	traces non identifiées	
13	CpUpCpApGp	0,9
	7MeGpUpCp5MeCpUpGp	0,85
14	ApUpUpUpAp2MeGp !	0,6
15	ApApUpUpCpGp	0,9
	1MeApUpCpCpApCpApGp	
16	6MeApUpCpCpApCpApGp	0,85
17	Ap2'OMeCpUp2'OMeGpApApYpApψp5MeCpUpGp	0,9

* Nombre d'oligonucléotides par mole de tRNA

** p ! = phosphate cyclique

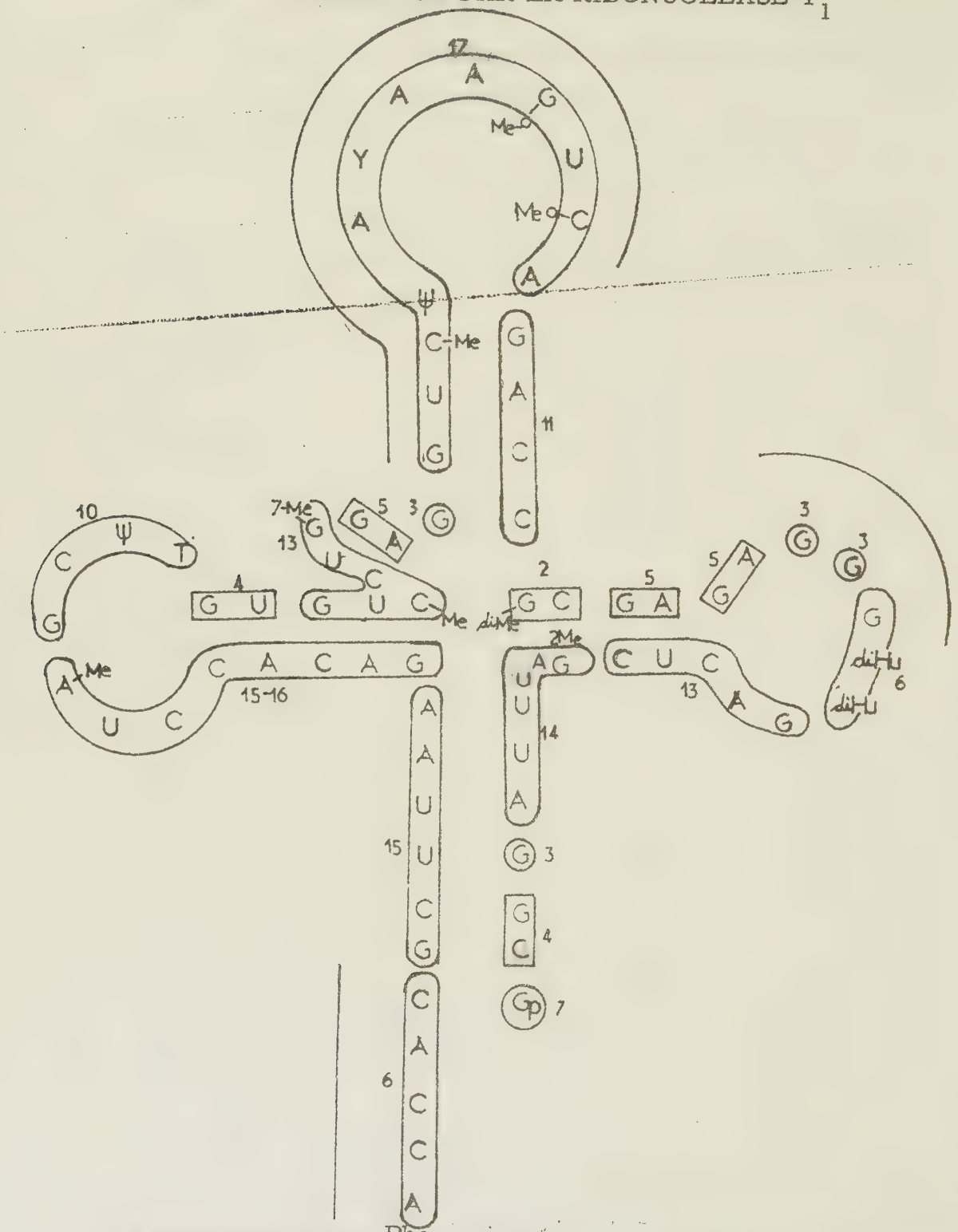
COMPOSITION DES FRAGMENTS OBTENUS APRES DIGESTION DU $tRNA^{Phe}$ PAR LA RIBONUCLEASE T_1 [b]

	$tRNA^{Phe}$ de levure de bière
Pic	Composition
1	Gp'. **
2	CpdiMeGp !
3	Gp
4	UpGp
	CpGp
5	ApGp
6	CpApCpCpA
	diHUpdiHUpGp
7	pGp
10	TpψpCpGp
11	CpCpApGp
13	CpUpCpApGp
	7MeGpUpCp5MeCpUpGp
14	ApUpUpUpAp2MeGp !
15	ApApUpUpCpGp
	1MeApUpCpCpApCpApGp
16	6MeA**pUpCpCpApCpApGp**
17	Ap2'OMeCpUp2'OMeGpApApYpApψp5MeCpUpGp

** p ! = phosphate cyclique

Figure 21

tRNA^{Phe} HYDROLYSE PAR LA RIBONUCLEASE T_1



- La séquence de tRNA^{Phe} est celle déterminée par RAJBHANDARY et coll. (1967).
- Les numéros correspondent au fractionnement de tRNA^{Phe} de levure de bière sur DEAE-cellulose.

CpApCpCpA qui doit migrer comme un oligonucléotide à 4 charges. On doit donc s'attendre à ce que les oligonucléotides UpGp, CpGp et ApGp (3 charges) soient élués avant l'oligonucléotide CpApCpCpA (4charges). Mais il faut tenir compte de la présence du trinucléotide diHUpdiHUpGp (4 charges également) qui peut être élué au même niveau. Dans ces conditions, le pic 6 (b) doit contenir A, C, G et diHU. Nous avons recherché la présence de ces constituants dans ce pic et nous les y avons effectivement trouvés. Compte tenu de ces corrections, nous pouvons donc donner la composition probable des oligonucléotides obtenus après digestion du $tRNA^{Phe}$ de levure de bière par la ribonucléase T_1 (tableau XXIII).

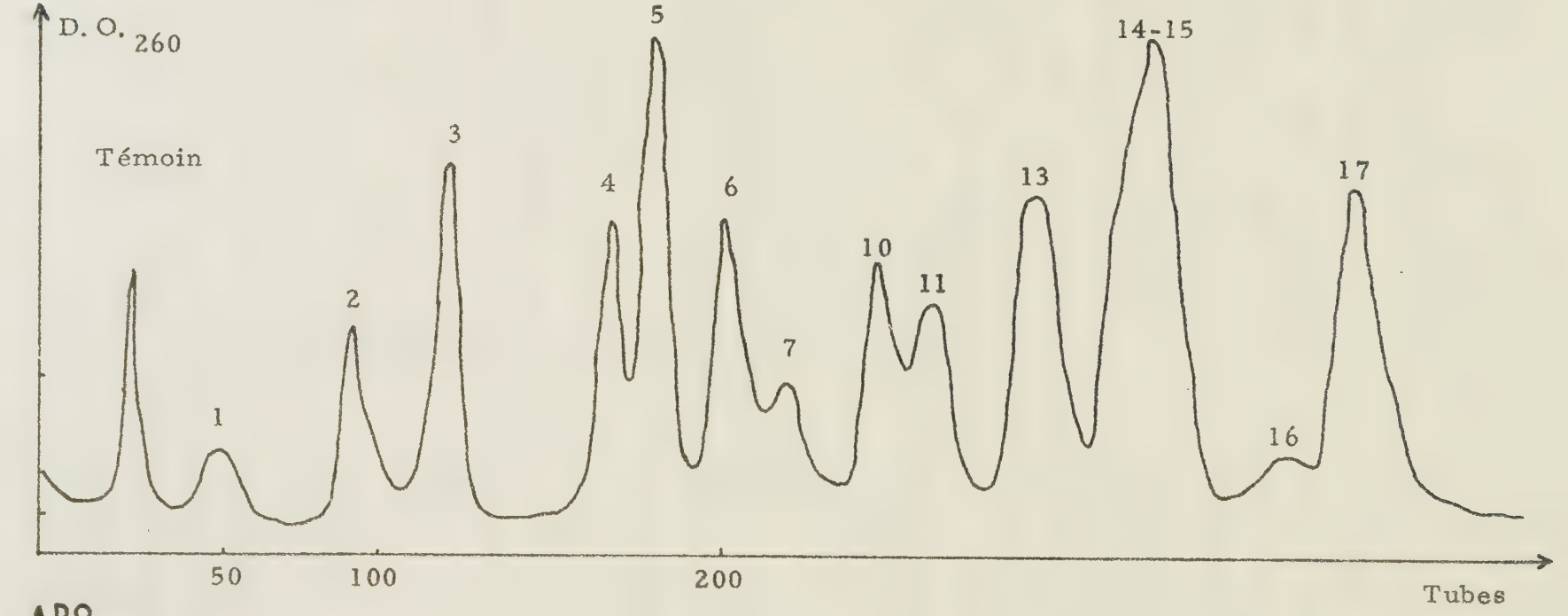
Nous avons représenté sur la figure 21 le modèle de structure secondaire du $tRNA^{Phe}$ proposé par RAJBHANDARY et coll. (1967). Nous y avons numéroté les oligonucléotides normalement formés par action de la ribonucléase T_1.

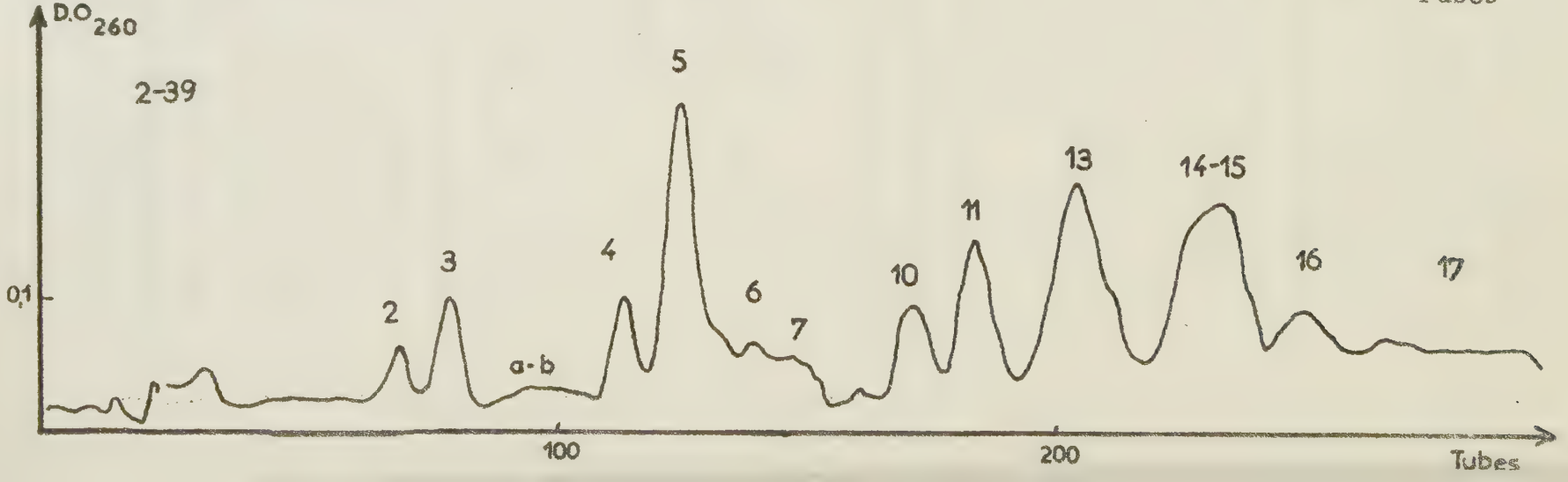
3) Etude du profil de fractionnement des oligonucléotides après action de la ribonucléase T_1 sur un $tRNA^{Phe}$ partiellement méthylé

Nous avons vu précédemment que, en présence de Mg^{++} 0, 02 M, la méthylation du $tRNA^{Phe}$ est assez fortement inhibée. Par exemple, un $tRNA^{Phe}$ qui fixe 5 $-CH_3$ par chaîne dans des conditions expérimentales données, en l'absence de Mg^{++}, ne fixera plus que 3 $-CH_3$ si la concentration en Mg^{++} atteint 0, 02 M. De plus, on sait que cette réduction affecte essentiellement la guanine. Nous avons donc pensé méthyler très partiellement le $tRNA^{Phe}$ pour voir quels résidus G (et éventuellement A ou C) étaient touchés en premier. Pour les déceler, nous avons effectué une hydrolyse par la ribonucléase T_1, suivie d'un fractionnement chromatographique des oligonucléotides obtenus. Rappelons que, au niveau des résidus 7-méthylguanine, il n'y a pas

Figure 22

CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE DE tRNA^{Phe} TEMOIN ET METHYLE TRAITES PAR LA RIBONUCLEASE T_1





d'hydrolyse par la ribonucléase T_1, de sorte que la méthylation doit se traduire par l'apparition de fragments plus longs entraînant une modification du profil d'élution chromatographique des oligonucléotides. De plus, la présence de groupes méthyle peut provoquer une diminution de la charge négative des nucléotides et par conséquent une migration plus rapide.

a - Etude de l'action du sulfate de méthyle non radioactif

La figure 22 (b) montre le profil de fractionnement obtenu avec une méthylation de 5 G, 3 A et 1 C en moyenne par chaîne. La comparaison avec le témoin (figure 22 a) montre, d'une manière immédiate, la diminution de deux pics : le pic 6 et le pic 17. Cependant, des différences moins importantes sont plus difficiles à apprécier. C'est pourquoi nous avons déterminé la surface des pics par découpage et pesée. Le rapport de la surface de chaque pic à la surface de la totalité des pics a été comparé dans les deux types de tRNA. Les résultats de cette étude sont consignés dans le tableau XXIV, qui groupe les résultats de plusieurs expériences.

Ce tableau confirme la diminution importante, pour des méthylations suffisamment poussées, des pics 6 (CpApCpCpA + diHUpdiHUpGp) et 17 (ApOMeCpUpOMeGpApApYpApΨpMeCpUpGp), mais il montre également une diminution du pic 3 (Gp) et à moindre degré du pic 4 (UpGp et CpGp). Il y a donc certainement plusieurs sites touchés parmi lesquels tout particulièrement la boucle de l'anticodon (pic 17) et l'un ou l'autre des deux fragments constituant le pic 6 ou les deux à la fois. Si l'on tient compte du fait que diHU n'absorbe pas 260 mμ et qu'en première approximation le trinucléotide diHUpdiHUpGp ne représente donc que le sixième de la densité optique et que la diminution de ce pic est supérieure à 1/6, on peut considérer que la diminution du

Tableau XXIV

COMPARAISON DE LA SURFACE DES PICS D'ABSORPTION UV APRES CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE DE $tRNA^{Phe}$ METHYLES ET TRAITES PAR LA RIBONUCLEASE T_1

	$\frac{\text{Surface du pic}}{\text{Surface totale}} \times 100$				
Echantillon	témoin	2 - 43 ^{14}C	2 - 17 ^{3}H	2 - 46 ^{14}C	2 - 39 ^{3}H
Pic					
2	3,6	3,0	3,2	3,6	3,0
3	8,2	7,3	7,1	6,7	4,3
(a + b)		0,5		2,0	1,3
4	6,0	5,5	5,5	3,5	4,2
5	10,3	12,9	12,6	12,6	18,2
(6)	(8)	(8)	(7,4)		(3,8)
6 + 7	10,7	12,9	10,4	5,1	6,8
(7)	(2,7)	(4,9)	(3,0)		(3,0)
10	6,0	5,4	5,4	5,4	5,6
11	5,6	5,7	5,6	8,3	8,5
13	11,5	12,2	13,0	17,2	18,6
14 + 15	23,2	21,5	22,3	23,6	18,5
16	2,0	5,1	5,1	1,2	3,0
17	13,0	7,4	9,9	10,8	7,5

fragment CpApCpCpA est certainement impliquée dans la diminution de ce pic. Mais, ceci n'exclut pas une diminution concomitante de la séquence diHUpdiHUpGp ; ce dernier point demande encore à être vérifié. La diminution du pic 3 (Gp) ainsi que celle du pic 4 (UpGp, CpGp) est plus difficile à interpréter étant donné que ces mono- ou dinucléotides sont situés à plusieurs endroits de la molécule. La disparition d'un pic peut être due à deux raisons :

1°, la méthylation du G qui le termine en position 3', ce qui empêche l'action de la ribonucléase T_1 à ce niveau. Dans ce cas, la diminution du pic doit s'accompagner de celle du pic voisin et de l'apparition d'un pic contenant un fragment plus long résultant de l'union des deux constituants précédents ;

2°, le déplacement d'un pic dans la séparation chromatographique par suite de la méthylation de A et de C situés à l'intérieur du fragment.

Ces divers phénomènes : diminution de certains fragments, apparition de fragments plus longs, changement de position par suite de modification de charge, pourront conduire à une image de fractionnement chromatographique plus ou moins facile à interpréter. Par exemple, la disparition d'un certain fragment pourra être compensée par l'apparition d'un fragment migrant au même niveau. Par ailleurs, le déplacement dû à l'allongement de certains oligonucléotides pourra être compensé par l'influence de la méthylation sur la charge de la molécule.

Dans le cas de la méthylation par le sulfate de méthyle non radioactif, la seule chose que l'on puisse vérifier facilement est la diminution des pics voisins et l'apparition d'un pic nouveau. Le tableau XXIV montre que l'on observe pas de diminution concomitante nette de la surface de deux pics adjacents. Par exemple, la diminution du fragment 6 ne s'accompagne pas régulièrement de celle du fragment 15.

De plus, on ne voit pas apparaître de fragments nouveaux très longs. Les pics dont la surface augmente (5, 11 et 13) correspondent à des longueurs de chaîne relativement faibles (3, 5 et 6 charges respectivement, si l'on ne tient pas compte de la perturbation de migration due à la méthylation).

Il s'avère donc que les phénomènes observés sont difficiles à interpréter sur la seule base des résultats de la variation de la densité optique après méthylation par le sulfate de méthyle. C'est pourquoi nous avons entrepris une étude de la méthylation du $tRNA^{Phe}$ par le sulfate de méthyle radioactif.

Mais, avant de passer à l'étude de l'action du sulfate de méthyle radioactif, il nous faut souligner un autre résultat du tableau. C'est l'absence de variation après méthylation du pic 12 contenant le fragment TpΨpCpGp, ce qui semblerait montrer que cette zone n'est pas accessible à la méthylation. Le résultat concernant le fragment adjacent 15 semble aller dans le même direction : le pic correspondant reste pratiquement constant sauf dans un cas de forte méthylation où il subit une diminution.

Il était également intéressant d'étudier le sort des séquences nucléotidiques contenues dans la petite boucle du $tRNA^{Phe}$ qui contient les fragments 5 et 13. Ici, l'interprétation est difficile car on observe une augmentation de la surface des pics correspondants due à l'apparition au même niveau de nouveaux fragments provenant d'autres régions modifiées.

b - Etude de l'action du sulfate de méthyle radioactif

La mise en évidence de l'apparition de nouveaux fragments peut être considérablement facilitée par l'emploi de sulfate de méthyle radioactif. En effet, la méthylation d'un G se traduira par l'apparition d'un fragment plus long et renfermant du 7-méthylG radioactif.

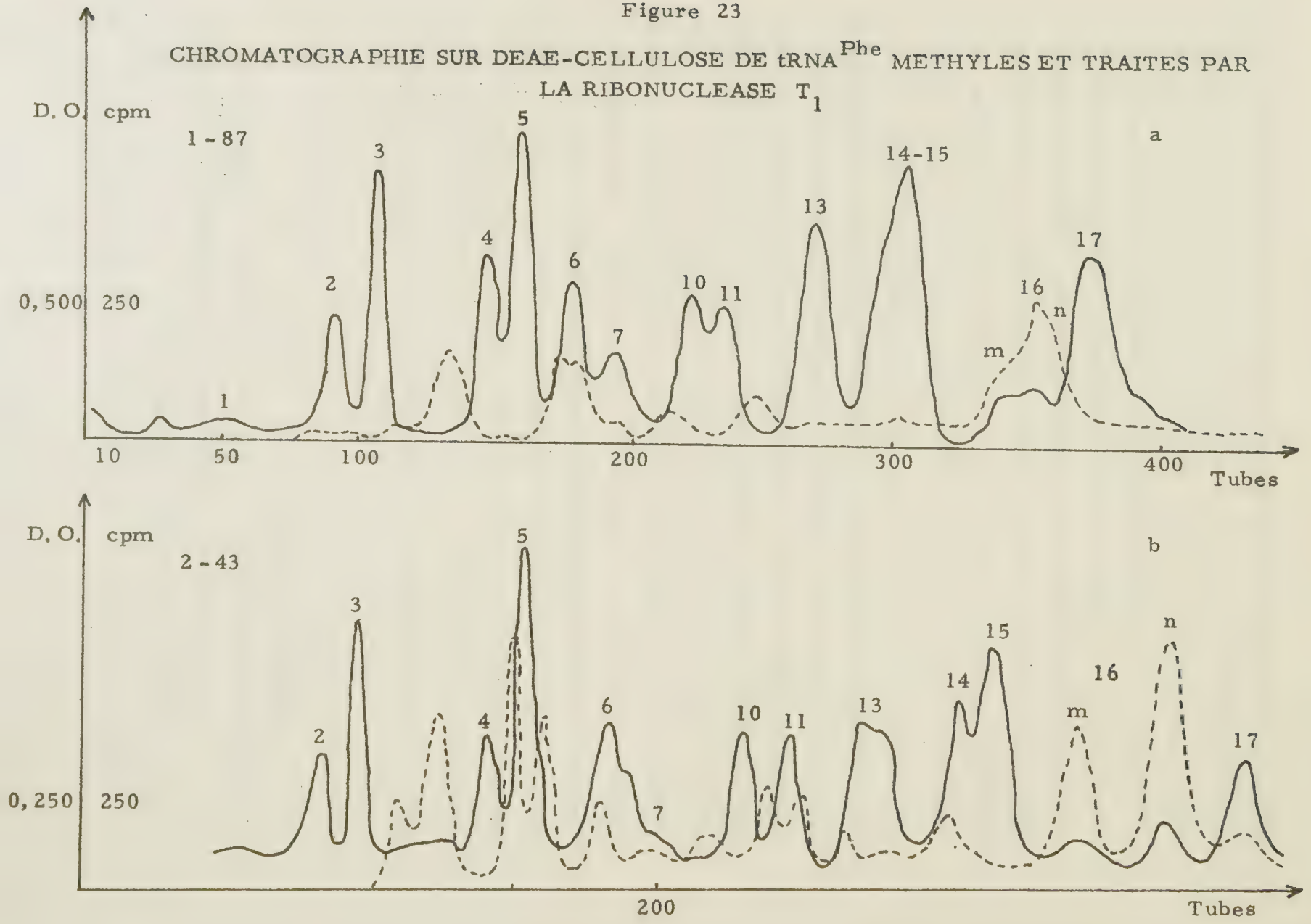
Mais, la radioactivité peut être également due à la méthylation de A ou C sans méthylation de G ; dans ce cas, il y aura apparition d'un pic nouveau résultant non pas de l'inhibition de l'hydrolyse au niveau de 7-méthylG, mais d'un déplacement dû à la méthylation de A et de C.

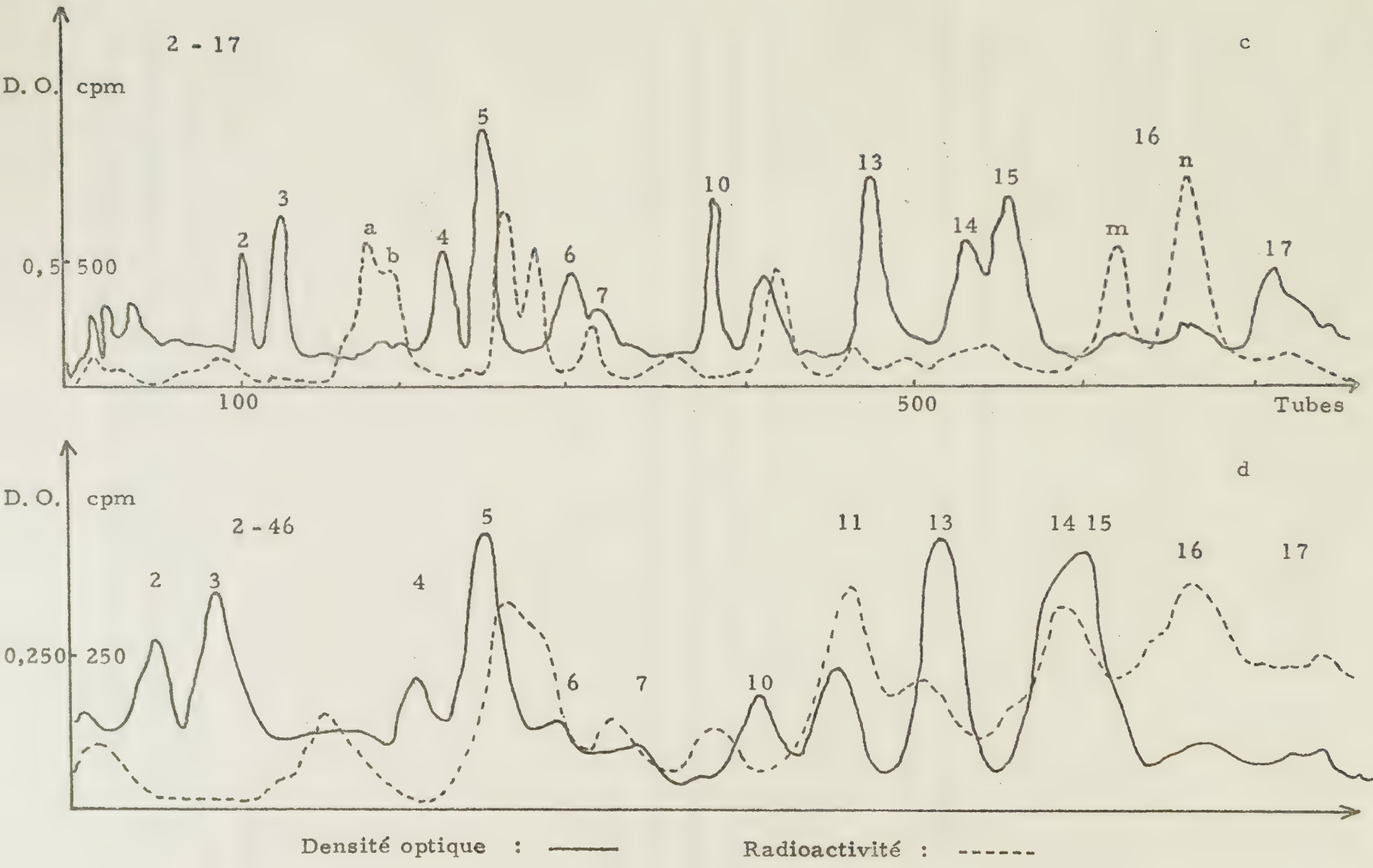
Le marquage du tRNA a posé quelques problèmes. Au début de ce travail, nous ne disposions que de sulfate de méthyle tritié, en solution benzénique, qui réagit difficilement en raison de la présence de benzène. Par la suite, nous avons disposé de sulfate de méthyle ^{14}C pur, mais le prix élevé du réactif n'en permettait pas l'utilisation en quantités importantes. Aussi, plutôt que d'effectuer de fortes méthylations avec une activité spécifique faible rendant l'analyse difficile, avons-nous préféré effectuer des méthylations relativement faibles avec une forte activité spécifique. Dans certains cas, nous avons ensuite complété la méthylation en ajoutant, dans un deuxième temps, une nouvelle quantité de sulfate de méthyle non radioactif. Nous avons cependant toujours recherché des conditions telles que le taux de méthylation ne soit pas trop élevé (présence de Mg^{++} 0, 02 M) pour éviter, dans la mesure du possible, une déstabilisation de la structure secondaire et tertiaire qui enlèverait toute signification aux résultats. Les profils de radioactivité obtenus sont reproduits dans les figures 23 (a, b, c, d) et correspondent à des degrés de méthylation différents :

- N° 1-87 méthylation de 1 heure à 20° avec 1,5 Me_2SO_4/P (moins de 1-CH_3 radioactif par chaîne).
- N° 2-43 méthylation de 2 heures à 20° avec 3 Me_2SO_4/P (2 -CH_3 radioactifs par chaîne).
- N° 2-17 1ère méthylation : 1 heure 30 à 20° avec 7 Me_2SO_4/P
  2ème méthylation : 22 heures à 4° avec 7 Me_2SO_4/P (4 à 5 -CH_3 radioactifs par chaîne)

Figure 23

CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE DE tRNA^{Phe} METHYLES ET TRAITES PAR LA RIBONUCLEASE T_1

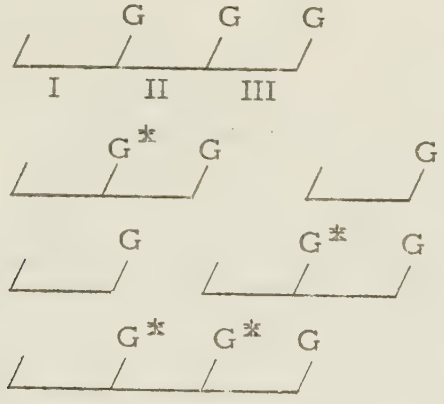



2 - 17
c
D. O.
cpm
0,5
500
2
3
a
b
4
5
6
7
10
13
14
15
m
16
n
17
100
500
Tubes
d
D. O.
cpm
0,250
250
2 - 46
2
3
4
5
6
7
10
11
13
14 15
16
17
Densité optique : ——
Radioactivité : ------

- N° 2-46 = 2-43 traité 9 heures à 4° par 9 Me_2SO_4/P (nombre de bases méthylées formées par chaîne : 7-méthylguanine : 5
1-méthyladénine : 3
3- méthylcytosine: 1).

L'examen de ces figures laisse immédiatement apparaître l'effet suivant : la position des pics radioactifs dans le profil de fractionnement est remarquablement constante. D'autre part, le nombre des pics est assez limité. Pour les plus faibles méthylations (figure 23 b), on observe 3 pics de radioactivité principaux ; pour des méthylations plus fortes, on observe de 6 à 10 pics dont 6 sont toujours plus importants que les autres.

Avant d'analyser d'une manière plus détaillée les profils de radioactivité obtenus, il convient d'étudier de plus près les diverses possibilités théoriques qui peuvent se présenter. Comme nous l'avons déjà souligné, toute méthylation de G se traduira par l'apparition d'un pic nouveau radioactif. Mais le même G méthylé pourra se retrouver dans plusieurs fragments différents. L'exemple suivant le montre :



(G* = 7-méthylG radioactif)

Lorsqu'une zone du tRNA renfermant plusieurs G est accessible, cette zone pourra apparaître en plusieurs pics. Le problème est encore compliqué par la méthylation concomitante de A et à un moindre degré de C, dans les fragments précédents. Dans le même fragment, on pourra

avoir un nombre variable de bases méthylées. Ceci ne serait pas gênant d'un point de vue purement qualitatif si la présence de ces bases méthylées en nombre plus ou moins grand ne provoquait, comme nous l'avons déjà mentionné, un déplacement de la migration de ces pics. Il peut en résulter une démultiplication d'un même pic. On voit donc qu'il n'y a pas de relation directe entre le nombre de pics radioactifs et le nombre de bases méthylées. Le problème est cependant simplifié par le fait que la proportion de G méthylé est plus grande que celle de A méthylé. On peut donc en conclure que le nombre de pics de radioactivité observés ne donne pas une mesure précise du nombre des sites de méthylation, mais cependant fournit une indication à ce sujet.

Une autre conséquence découle de la discussion précédente : il n'y a pas de relation obligatoire entre la composition des pics radioactifs et celle des pics initiaux élués au même niveau. La seule indication de la position du pic radioactif sera celle du nombre de charges qu'il porte et encore faudra-t-il tenir compte des modifications de charge apportées par la présence des groupes méthyle. Lorsqu'on étudie la répartition des pics radioactifs dans les différents profils de fractionnement, on constate d'ailleurs qu'ils ne se superposent que rarement avec le profil UV.

Un renseignement important sur la signification des pics sera donné par l'analyse des bases méthylées radioactives. En effet, la présence de 7-méthylguanine radioactive signifiera obligatoirement que le pic résulte de la jonction de deux fragments juxtaposés. Par contre, l'absence de 7-méthylguanine marquée signifiera que le pic radioactif correspond à un fragment trouvé dans le profil du tRNA témoin non méthylé.

Cette analyse a été effectuée sur un certain nombre de pics radioactifs correspondant à la figure 23 d (2-46). Pour

7-méthylG et 1-méthylA, les radioactivités suivantes ont été trouvées (exprimées en c. p. m.) :

pic 5	7-méthylguanine :	370	1-méthyladénine :	0
pic 11	"	510	"	170
pic 14-15	"	830	"	310
pic 16	"	355	"	452

On constate que, dans tous ces pics étudiés jusqu'ici, on retrouve de la 7-méthylguanine. Par conséquent tous les fragments doivent correspondre à des fragments allongés résultant de la juxtaposition de deux ou plusieurs fragments adjacents. Cependant, l'interprétation des résultats s'avère délicate dans l'état actuel de notre travail. Dans un cas pourtant une interprétation est possible. C'est celui du fragment 5 qui ne renferme comme base radioactive que la 7-méthylguanine. Comme ce pic est élué au niveau des dinucléotides, on peut faire l'hypothèse qu'il contient 2 G adjacents situés dans la boucle renfermant les diHU. Ce résultat pourrait être en accord avec la diminution de la densité optique du pic 3 (Gp).

Dans le pic b (élué entre les pics 3 et 4), les premiers résultats font apparaître la présence de 1-méthyladénine et l'absence de 7-méthylguanine. Si cette observation se confirme, elle pourrait être interprétée en fonction de la diminution du pic 6, conséquence possible de la méthylation du A 3'-terminal.

Il faut signaler un cas particulier où une méthylation de G peut avoir lieu sans qu'elle signifie l'apparition d'un fragment allongé. Il s'agit de la méthylation du nucléotide 2'-CMeG situé dans l'anticodon du $tRNA^{Phe}$. En effet, la présence du $-CH_3$ sur le -OH en 2' du ribose inhibe déjà l'action de la ribonucléase T_1 sur le $tRNA^{Phe}$ normal (pic 17). On peut se demander si les pics m et n, contenant plus de méthyl A que de MeG radioactives, ne représentent pas le fragment (17) plus ou moins

déplacé par suite de la méthylation de G et de A. La structure de ce fragment est en effet caractérisée (voir tableau XXIII) par la présence de plusieurs nucléotides adényliques dans la boucle de l'anticodon. La diminution de l'absorption UV du pic 17 et l'augmentation concomitante de la densité optique au niveau des pics radioactifs m et n pourraient être en faveur de cette interprétation.

DISCUSSION

L'étude des sites accessibles à la méthylation dans le $tRNA^{Phe}$ s'est révélée complexe. Les indications que nous pouvons actuellement en tirer restent fragmentaires et doivent être complétées par une étude plus approfondie. Nous pensons actuellement que seule une étude de la séquence des pics radioactifs pourra permettre de préciser sans ambiguité les sites accessibles au réactif méthylant. Cette étude devrait maintenant être possible à la suite de l'introduction dans notre laboratoire des techniques d'analyse par "fingerprint" des oligonucléotides marqués selon la méthode de SANGER.

Cependant, il nous est déjà possible, à la suite des travaux précédents, en combinant les résultats de l'étude de la variation de la densité optique et des indications données par la localisation et la composition des pics radioactifs de tirer quelques conclusions probablement définitives. D'abord, il faut souligner le fait qu'en présence d'ions Mg^{++} le nombre des régions attaquées apparaît restreint. Ceci est en accord avec une étude, effectuée par DIMITREVIEZ, GRUNBERG-MANAGO et DIRHEIMER, 1968), qui a montré la très grande résistance du $tRNA^{Phe}$ à l'attaque par une endonucléase de rein de mouton. Il semble que le $tRNA^{Phe}$ ait une structure plus compacte que

d'autres tRNA. Nous verrons au chapitre suivant que l'activité biologique du $tRNA^{Phe}$, en particulier sa capacité acceptrice, est plus résistante envers divers agents de modification chimique que celle d'autres tRNA. Ce résultat peut également s'interpréter par la stabilité plus grande de la configuration de ce tRNA.

Deux sites sont certainement très accessibles à l'agent de méthylation. Il s'agit de la boucle de l'anticodon et de la zone 3'-terminale avec le triplet pCpCpA.

Nos résultats mettent également en évidence l'attaque très probable des G situés dans la boucle du diHU, ainsi que celle possible du G contenu dans la séquence diHUpdiHUpGp.

Le troisième résultat, également certain, est la non atteinte de la région TpΨpCpGp.

Il est intéressant de confronter ces résultats avec les observations provenant de l'étude des sites accessibles à diverses autres modifications chimiques ou réactions enzymatiques dans d'autres tRNA, spécifiques ou non.

YOSHIDA et UKITA (1966, 1968) ont ainsi montré que le pentanucléotide GpTpΨpCpGp n'était pas modifié par la cyanoéthylation (qui est spécifique de Ψ et de I) quand la réaction avec l'acrylonitrile a lieu en présence de NaCl 0,5 M, concentration saline qui permet de stabiliser la structure secondaire (YOSHIDA et UKITA, 1965 b). HO et GILHAM (1967) ont mis au point une technique de modification réversible de U, T et G par le N-cyclohexyl-N'-β-(4-méthylmorpholinium) éthylcarbodiimide p-toluène sulfonate, qui permet d'obtenir des coupures spécifiques au niveau de G avec la ribonucléase pancréatique ; mais bien que AUGUSTI-TOCCO et BROWN (1965) aient vérifié que l'action de ce réactif dépendait de la structure secondaire des molécules (absence ou présence de Mg^{++} 0,01 M), IVANOVA, KNORRE et MAL'YGIN (1967) n'ont pas réussi à interpréter les profils de fractionnement qu'ils ont obtenus.

Quelques travaux, encore peu nombreux, avec des tRNA spécifiques ont permis de préciser encore davantage la localisation de l'attaque de plusieurs réactifs chimiques. C'est ainsi que la bromuration de $tRNA^{Ala}$ par la N-bromosuccinimide a été étudiée dans le laboratoire de HOLLEY en présence de Mg^{++} 0,015 M. La localisation des zones les plus sensibles à cette réaction a été recherchée (NELSON, RISTOW et HOLLEY, 1967). Les mêmes auteurs ont étudié la désamination nitreuse du $tRNA^{Ala}$ en présence de Mg^{++} 0,01 M. Les régions les plus accessibles aux deux types de réactif sont celles de l'anticodon, de la boucle contenant diHU et du pCpCpA. Ici encore, la zone de la séquence TpΨpCpGp paraît peu touchée, ce qui est en accord avec les observations précédentes de YOSHIDA et UKITA. Un résultat analogue a été obtenu par BROSTOFF et INGRAM (1967 a, b), en faisant réagir une carbodiimide spécifique de U, Ψ, G et I sur le $tRNA^{Ala}$ de levure stabilisé par la présence d'ions Mg^{++} (0,02 M). La séquence TpΨpCpGpApUp ne réagit pas, encore une fois.

Les résultats des modifications chimiques ont été confirmés par des travaux sur l'accessibilité de certaines régions à diverses actions enzymatiques. Nous citerons en particulier les expériences de digestion enzymatique partielle par la ribonucléase pancréatique ou par la ribonucléase T_1, de PENSWICK et HOLLEY (1965), de ARMSTRONG et coll. (1966), de WAGNER et INGRAM (1966), de ZACHAU et coll. (1966), de BAEV et coll. (1967). Ces travaux ont montré la grande sensibilité de la région de l'anticodon à ces attaques et la protection fréquemment observée de la région TpΨpCpGp.

On constate donc que les résultats de notre étude des sites accessibles à la méthylation dans le $tRNA^{Phe}$ vont dans le même sens que les résultats d'autres auteurs obtenus avec d'autres tRNA. Il apparaît de plus en plus sûr que la zone de l'anticodon, celle du triplet

pCpCpA terminal et celle du diHU sont des zones accessibles, tandis que la région du TpψpCpGp est masquée probablement par la configuration tertiaire. Ces considérations sont très importantes pour la connaissance des régions impliquées dans les activités biologiques des tRNA. Cet aspect fera l'objet du prochain chapitre de notre travail.

QUATRIEME PARTIE

APPLICATION DES REACTIONS D'ALCOYLATION DES RNA A L'ETUDE DES ACTIVITES BIOLOGIQUES

CHAPITRE VII

INFLUENCE DE L'ALCOYLATION SUR LA CAPACITE ACCEPTRICE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES DE TRANSFERT

INTRODUCTION

Rappelons brièvement les propriétés fondamentales des acides ribonucléiques de transfert (ou tRNA). On sait que pour chaque aminoacide susceptible d'être intégré dans les protéines, il existe un ou plusieurs tRNA spécifiques. Ces tRNA présentent entre eux de grandes analogies (poids moléculaires voisins, configuration générale des molécules probablement semblable, répartition identique de certains groupes d'oligonucléotides). Cependant, l'étude plus précise de leurs séquences montre que chaque tRNA spécifique est caractérisé par un enchaînement de bases qui lui est propre.

Les deux grandes propriétés biologiques que l'on reconnaît aux tRNA sont :

1°) La capacité acceptrice ou fixation spécifique d'un aminoacide. Celui-ci est au préalable activé sous forme d'aminoacyladénylate par un enzyme spécifique (aminoacyl-tRNA synthétase) selon le schéma

aminoacide + ATP + enzyme $\rightleftharpoons$ enzyme-AMP-aminoacide + PP

Ce même enzyme peut alors transférer l'aminoacide de l'anhydride mixte à l'extrémité de la chaîne du tRNA correspondant, avec formation d'une liaison ester entre le carboxyle de l'aminoacide et un hydroxyle du ribose du nucléotide adénylique terminal (tous les tRNA sont terminés par un triplet commun pCpCpA). La réaction peut être ainsi représentée :

enzyme-AMP-aminoacide + tRNA $\rightleftharpoons$ tRNA-aminoacide + AMP + enzyme

2°) Le transfert des aminoacides dans les protéines dans un ordre déterminé par la succession des triplets "codons" du RNA messager (mRNA). Cette étape a lieu au niveau des ribosomes dont les deux sous-unités 30S et 50S sont nécessaires pour que le complexe aminoacyl-tRNA-mRNA-ribosomes puisse conduire à la formation de la liaison peptidique. Elle nécessite la présence de GTP et de toute une série de facteurs intervenant dans l'initiation et l'élongation de la chaîne peptidique.

L'un des problèmes intéressants de la biologie moléculaire est de déterminer les sites qui sont responsables, dans la structure des tRNA, des diverses activités de cette molécule multifonctionnelle. Malgré l'importance des informations relatives à la structure primaire des tRNA, les connaissances relatives à ce problème restent encore très fragmentaires.

Il faut d'abord, en premier lieu, signaler l'importance de la conformation tridimensionnelle des RNA de transfert pour leurs activités biologiques. Les fonctions des tRNA sont profondément affectées lorsqu'elles sont effectuées aux températures où la structure secondaire est déstabilisée, mais cet effet peut être attribué à la dénaturation des protéines enzymatiques impliquées dans ces fonctions. Cette difficulté a pu être contournée par ARCA et coll. (1964, 1967) grâce à

l'emploi du tRNA et des enzymes d'une bactérie thermophile Bacillus stearothermophilus. Dans ce cas, la capacité acceptrice a pu être testée à température élevée puisque les aminoacyl-tRNA synthétases restent encore actives à une température où la structure secondaire des tRNA commence à être stabilisée. La chute considérable de la fixation des aminoacides observée dans ces conditions montre que la structure secondaire des tRNA est essentielle pourleur activité acceptrice. Par ailleurs, il a été montré par WERENNE, GROSJEAN et CHANTRENNE (1966) et par WERENNE et BEFORT (1968) dans notre laboratoire que l'addition de proflavine ou de bromure d'éthidium, qui déstabilisent la structure secondaire en s'intercalant entre les plateaux des bases, provoquait l'inactivation des diverses activités biologiques des tRNA.

L'efficacité des deux formes native et dénaturée des tRNA, déjà mentionnée chapitre V, a été testée par LINDAHL et coll. (1967) pour toute une série de réactions des tRNA. Ces travaux ont montré que la reconnaissance du tRNA par les divers enzymes impliqués dans ces phénomènes nécessite une conformation unique, native, du tRNA, la forme dénaturée ne présentant aucune activité. Ces résultats montrent la sensibilité de l'activité biologique des tRNA à des modifications de la structure tertiaire.

Un grand nombre de travaux ont déjà été effectués pour essayer de localiser d'une manière précise les régions des tRNA que reconnaît l'aminoacyl-tRNA synthétase correspondante. Jusqu'à présent, les résultats restent très limités. La participation de l'anticodon au site de reconnaissance des tRNA par les aminoacyl-tRNA synthétases a été suggéré mais il apparaît actuellement, à la suite de toute une série d'expériences de modifications enzymatiques ou chimiques et de travaux effectués sur la structure des tRNA de mutants suppresseurs que cette hypothèse est peu probable. On ne possède pratiquement pas d'information sur la participation éventuelle d'autres régions au site de -

fixation. Il semble que la modification, par divers réactifs, des thiopyrimidines (chez E. coli) provoque une inactivation de la capacité acceptrice. Par contre, la modification du diHU ne semble pas entraîner d'effet sur la capacité acceptrice (la bibliographie de ces questions est très abondante, aussi renvoyons-nous à la revue de EBEL, 1968).

Très récemment, SCHULMAN et CHAMBERS (1968), à la suite d'une étude sur l'inactivation du $tRNA^{Ala}$ par irradiation UV, ont apporté quelques arguments en faveur d'un rôle des trois premières paires de bases situées près des extrémités 3' et 5' terminales ; la structure ordonnée de cette région serait indispensable à l'activité du tRNA. Pour SCHULMAN et CHAMBERS, s'il y a identité entre les trois paires terminales de deux tRNA d'espèces différentes, il est possible que l'un des tRNA reconnaisse l'enzyme hétérologue. Si non, la reconnaissance "croisée" ne fonctionne pas. Cependant, STAEHELIN et coll. (1968) observent la même affinité de la serine-tRNA synthétase pour les $tRNA^{Ser}$ de levure ou de foie de rat, alors que les trois paires terminales sont très différentes.

----- UpGpApUpGp	------ ApApCpGpGp
----- ApCpUpApCpGpCpCpA	----- UpUpGpUpCpGpCpCpA
$tRNA^{Ser}$ de foie de rat	$tRNA^{Ser}$ de levure

Ce problème reste donc non résolu actuellement.

Dans tous ces travaux, l'approche qui a été en général employée a été la caractérisation des sites actifs des tRNA par la réalisation de modifications enzymatiques ou chimiques des tRNA et l'étude de l'effet de ces diverses modifications sur les activités biologiques.

La réalisation de coupures internucléotidiques en nombre limité par l'emploi d'endonucléases dans des conditions ménagées a, en effet, permis d'obtenir des résultats intéressants dans la mesure où

ces coupures ne détruisaient pas la structure secondaire ou tertiaire des tRNA (NISHIMURA et NOVELLI, 1963, 1964 ; BAEV et coll., 1967). Mais ce sont surtout de nombreuses modifications chimiques de bases qui ont été employées. Pour une revue de la question, nous renvoyons aux articles de MIURA (1967) et de EBEL (1968). Nous ne mentionnerons ici que quelques réactions qui ont été utilisées dans notre laboratoire : réactions d'halogénations (chloruration : DUVAL et EBEL, 1967 - bromuration : DUVAL et EBEL, 1965 a ; WEIL et coll., 1964 - ioduration : YOSHIDA, DUVAL et EBEL, 1968) ; acétylation : KEITH et EBEL, 1968 ; action de l'acide monoperphtalique : GANGLOFF et EBEL, 1968 ; action de l'acide nitreux : BEFORT, KEITH et EBEL, 1968. La modification spécifique d'une base peut encore être réalisée par incorporation biologique d'un analogue structural d'une base. L'activité biologique de tRNA, où l'uracile était remplacé par le 5-fluorouracile, a été étudiée dans notre laboratoire par GIEGE et coll. (1968 a et b).

Les modifications les plus intéressantes sont celles qui touchent spécifiquement un petit nombre de bases. Mais, le critère de spécificité de modification n'est pas suffisant. Nous avons vu l'importance de la structure secondaire et tertiaire des tRNA pour leur activité biologique. Or, un grand nombre de modifications chimiques provoque une altération de ces structures. Cet effet secondaire des modifications chimiques représente une sérieuse difficulté pour l'interprétation de leur effet sur les activités biologiques des tRNA et une limitation notable de ce type d'approche.

C'est dans cette optique que nous discuterons les résultats qu'ont donnésles études de l'effet de l'alcoylation des tRNA sur certaines de leurs propriétés biologiques et plus particulièrement sur la capacité acceptrice. Vu l'importance de l'intégrité de la structure tridimensionnelle des tRNA pour leurs activités biologiques, il convenait de

réaliser les modifications chimiques dans des conditions qui aient le plus de chances de maintenir cette configuration intacte. La réalisation de modifications chimiques en milieu organique ne représente pas, à ce point de vue, des conditions idéales, étant donné que la structure secondaire est détruite dans ce milieu et que les modifications se font au hasard le long de la chaîne, rendant ainsi plus difficile la reconstitution de la structure tridimensionnelle initiale. Les résultats de l'étude physico-chimique confirment la déstabilisation rapide de la structure secondaire lorsque les alcoylations (méthylation et allylation) sont effectuées en milieu DMF (chapitre III et IV). Cette étude de l'effet des alcoylations en milieu DMF a cependant été réalisée et nous en mentionnerons les résultats dans ce chapitre, car à l'époque où ces études ont débuté, l'extrême sensibilité des propriétés biologiques des tRNA à leur structure tridimensionnelle n'apparaissait pas encore clairement.

Les conditions d'alcoylation qui auront le plus de chances de donner des résultats seront celles réalisées en milieu aqueux et en présence de Mg^{++} pour stabiliser la structure tridimensionnelle.

A. MATERIEL ET METHODES

I. PRODUITS EMPLOYES

- tRNA : Nous avons employé soit des tRNA de levure de boulangerie préparés selon les techniques décrites au chapitre I, soit une préparation commerciale de sRNA de levure de bière (BOEHRINGER, Mannheim).

- aminoacides marqués : Nous avons utilisé des aminoacides marqués au ^{14}C (C.E.A.).

II. TECHNIQUE DE FIXATION DES AMINOACIDES SUR LES tRNA

La technique utilisée est celle décrite par WEIL et coll. (1964) avec les modifications apportées par divers travaux du laboratoire relatés par DIRHEIMER et EBEL (1967) et GIEGE et EBEL (1968).

1) Préparation des aminoacyl-tRNA synthétases

La préparation enzymatique est obtenue à partir de levure de boulangerie Saccharomyces cerevisiae fraîchement cultivée sur un milieu à base de "Yeast Extract".

a - Culture de la levure

10 g de levure sont cultivés dans les conditions rappelées dans le chapitre I pour l'extraction du RNA. Lorsque la densité optique initiale a doublé, on verse la culture sur de la glace pilée pour la stopper. La culture ainsi bloquée est centrifugée à 4 000 tours/minute pendant 5 minutes dans une centrifugeuse JOUAN refroidie. Le culot est lavé deux fois avec la solution dite "tampon enzyme" dont la composition est la suivante :

Tris-HCl	0,1	M
KCl	0,06	M
$MgCl_2$	0,01	M
Glutathion réduit	0,001	M (le glutathion peut être remplacé par la mercaptoéthylamine (113 mg) ou par la cystéine 0,001 M)

Pour réaliser ce tampon, on peut prendre : 100 ml de Tris-HCl M pH 7,4 - 20 ml de KCl 3 M - 10 ml de $MgCl_2$ M - 300 mg de glutathion - H_2O : q. s. p. 1 litre.

La levure, répartie en fractions de 10 g et congelée à -20°, peut être conservée environ 1 semaine.

b - Broyage des cellules et préparation du surnageant 105 000 g

Le broyage de 10 g de levure est effectué, après addition de 10 ml de "tampon enzyme" et de 50 g de billes de verre (0,5 mm de diamètre), dans un broyeur cellulaire BRAUN pendant 3 minutes (2 fois 1,5 minute). Le refroidissement est assuré par un jet de neige carbonique.

Les billes de verre sont éliminées par une centrifugation à 17000 tours/minute pendant 15 minutes (centrifugeuse SORVALL refroidie). Le surnageant obtenu est centrifugé à 40000 tours/minute pendant 2 heures ou à 50000 tours/minute pendant 1 heure 30 minutes(105000g). On prélève les 2/3 supérieurs de ce surnageant 105000 g.

c - Elimination des aminoacides

Dans ce but, on fait passer le surnageant sur une colonne de SEPHADEX G25, équilibrée avec le "tampon enzyme". Pour 10 g de levure initiale, on utilise une colonne de 42 cm de haut et de 1 cm de diamètre. L'éluat est recueilli par fractions de 2 ml. Les protéines enzymatiques sortent vers le 7ème tube (on le vérifie en prenant la D.O. à 280 mμ) ; on recueille en tout 8 ml.

d - Elimination des tRNA contenus dans la préparation par chromatographie sur DEAE-cellulose

Ces 8 ml sont alors passés sur une colonne de DEAE-cellulose SERVA (2,5 ml de volume) préparée de la façon suivante : la DEAE-cellulose est traitée une demi-heure par NaOH N (à raison de 1 litre pour 30 g de cellulose), lavée à l'eau jusqu'à neutralité des eaux de lavage puis équilibrée avec le "tampon enzyme". On élue avec ce même tampon et on recueille les 25 premiers ml.

e - Dosage de la préparation enzymatique

Le rapport des D. O. à 280 mμ et à 260 mμ est voisin de 1, 75 pour une préparation dépourvue d'acides nucléiques. La concentration en mg de protéines par ml est alors donnée par la relation

$$(D.O._{280} \times 1,55) - (D.O._{260} \times 0,76)$$

f - Conservation de l'enzyme

La préparation enzymatique est répartie en plusieurs fractions et conservée à -60°. Son activité reste stable pendant plusieurs jours (alors qu'on observe une chute de l'activité si la conservation a lieu à -20°).

2) Composition du milieu réactionnel pour le test de fixation

Le volume final du milieu réactionnel est de 1 ml. Pour 200 μg de tRNA, on utilise 600 μg de protéines enzymatiques dosées comme il est indiqué plus haut. Cette quantité représente l'optimum nécessaire pour la plupart des aminoacides.

Le milieu réactionnel a la composition suivante :

- ATP 5 μmoles (0, 05 ml d'une solution commune 0, 1 M en ATP et 0, 1 M en $MgCl_2$ ajustée à pH 7)
- $MgCl_2$ 11 μmoles
- glutathion réduit 600 μg
- sérumalbumine bovine 200 μg
- tampon enzyme q. s. p. 1 ml

  Le pH est ajusté à 7, 4.
- tRNA
- aminoacide ^{14}C 0, 1 à 0, 2 μmoles (environ 1 μC)

En pratique, on prépare pour l'ensemble des tubes de réaction :

- une solution I (ATP + glutathion: 0,05 ml d'une solution à 2 mg/ml + sérumalbumine: 0,1 ml d'une solution à 12 mg/ml + tampon enzyme: q. s. p. 0,4 ml par tube), dont le pH est ajusté à 7,4 avec KOH N.
- une solution II (enzyme + tampon enzyme q. s. p. 0,4 ml par tube). Les solutions I et II sont mélangées en une solution III. Dans chaque tube on ajoute à 0,8 ml de cette solution III : 200 µg de tRNA (0,1 ml de solution à 2 mg/ml) et 0,1 ml de solution d'aminoacide à 1 ou 2 µmoles/ml.

La réaction a lieu au bain-marie à 37° pendant 30 minutes. Elle est arrêtée par addition de 1 ml d'acide trichloracétique à 10 p. 100 (TCA 10 p. 100).

3) Lavage et détermination de la radioactivité

Après une demi-heure de précipitation à 4°, le précipité est lavé deux fois avec 5 ml de TCA 5 p. 100 puis deux fois avec 5 ml d'alcool éthylique à 95°. Toutes ces opérations sont effectuées à 4°. Le précipité est ensuite dissous dans 0,3 ml d'eau et la radioactivité est comptée en présence de 10 ml de mélange scintillateur à l'aide du compteur à scintillation Tricarb PACKARD. La composition du mélange est la suivante :

- BBOT = bis- 5'-tert. butylbenzoxazolyl(2') thiophène (CIBA, Bâle)	4 g
- naphtalène (PROLABO)	80 g
- toluène (MERCK)	600 ml
- méthylcellosolve (MERCK)	400 ml

Les résultats sont exprimés en mµmoles d'aminoacide fixé par mg de tRNA.

B. RESULTATS ET DISCUSSION

I. INFLUENCE DE LA METHYLATION SUR LA CAPACITE ACCEPTRICE DES tRNA

Une première étude sur l'influence de la méthylation des tRNA de levure par le sulfate de méthyle en milieu acétate de potassium 0,4 M a été effectuée dès 1964 par WEIL, BEFORT et coll. qui ont observé une diminution de la capacité acceptrice des tRNA pour toute une série d'aminoacides (Phe, Lys, Val, Leu). Cette diminution était d'autant plus importante que le taux de méthylation était plus élevé (jusqu'à 20 à 30 p. 100 de 7-méthylguanine). Les résultats trouvés n'étaient pas constants : tantôt ces diminutions étaient à peu près identiques pour les divers aminoacides testés, tantôt on notait quelques différences d'un tRNA à l'autre.

En 1965, NESTEROVA a également constaté une chute de la capacité acceptrice du tRNA méthylé pour la lysine et la phénylalanine, les variations étant du même ordre de grandeur. CERNA, RYCHLIK et SORM (1066) ont étudié divers sRNA méthylés (jusqu'à 20 p. 100 de résidus guanine transformés en 7-méthylguanine) : la capacité acceptrice pour 9 aminoacides décroît encore quand la méthylation augmente. L'ordre est le suivant :

Met Leu Tyr Ser Thr Lys Ala Pro Ile

Enfin ZAKHARYAN, VENKSTERN et BAEV (1967) ont également constaté des chutes comparables de la fixation de 5 aminoacides (Val, Lys, Ser, Gly, Ala) en fonction de la méthylation.

Ces résultats peuvent avoir trois causes indépendantes ou simultanées :

1°) l'atteinte par la méthylation du ou des sites responsables de la capacité fixatrice.

2°) une déstabilisation de la structure secondaire sous l'influence de la méthylation.

3°) la méthylation d'une ou de plusieurs bases du triplet pCpCpA terminal, site de fixation commun à tous les tRNA dont la modification peut entraîner la non-reconnaissance par l'enzyme.

Le fait que la méthylation conduise à une atteinte de la capacité acceptrice comparable chez tous les tRNA suggère que l'un des deux derniers phénomènes vienne effectivement se surajouter à une possible attaque spécifique d'un site.

L'attaque de la structure secondaire est cependant relativement peu vraisemblable, car nous avons montré au chapitre III que l'altération des courbes de fusion et la variation du Tm étaient minimes pour les taux de méthylation employés dans ces expériences. Il faudrait déjà admettre une modification discrète de la structure tertiaire, non décelée par les courbes de fusion.

Par contre, la modification du triplet pCpCpA terminal apparaît très probable à la suite d'une série d'observations. Dans notre laboratoire, des expériences de méthylation ont été effectuées par Mme BEFORT (1968) sur des tRNA dont le triplet pCpCpA terminal avait été enlevé par action de la phosphodiestérase de venin de serpent dans les conditions de ZUBAY et TAKANAMI. Le triplet pCpCpA a été rattaché par addition de CTP et d'ATP (^{32}P) en présence de la pCpCpA-pyrophosphorylase de levure, l'aminoacide ^{14}C a ensuite été fixé dans les conditions habituelles. Le rapport $\frac{\text{aminoacide } ^{14}C \text{ fixé}}{\text{pCpCpA}(^{32}P)\text{refixé}}$ a été déterminé. Ces expériences ont montré que ce rapport restait égal à 1 ou ne diminuait que très faiblement pour des taux de méthylation croissants. Ce résultat suggère que la baisse importante de la fixation des aminoacides observée après méthylation des tRNA pourvus de leur triplet terminal était essentiellement due à la méthylation d'une ou de plusieurs bases de ce triplet.

Cette interprétation a été confirmée par les études de ZAKHARYAN, VENKSTERN et BAEV (1967, 1968) qui ont montré, par analyse des nucléosides terminaux, qu'effectivement A et C du pCpCpA terminal étaient méthylés. En présence de $MgCl_2$, la méthylation du A et du C terminaux ne change pas, tandis que celle de G diminue. Selon ces auteurs, la diminution de la capacité acceptrice semble directement liée au nombre de A et C méthylés et semble être beaucoup moins dépendante du taux de 7-méthylguanine. Ce dernier résultat est en accord avec la très faible décroissance, mentionnée plus haut, du rapport $\frac{\text{aminoacide fixé}}{\text{pCpCpA refixé}}$ après méthylation du tRNA dépourvu de pCpCpA.

Nous avons pensé que la méthylation par le sulfate de méthyle en milieu diméthylformamide pouvait apporter une autre confirmation à l'importance de l'influence de la méthylation de A et de C sur la fixation des aminoacides. Nous avons vu (chapitre III) que, pour de faibles quantités de sulfate de méthyle par rapport au RNA dissous dans le DMF, on observait la méthylation de G, de A et de C. Mais, lorsque le taux de sulfate de méthyle ajouté par nucléotide augmente, la méthylation de A et de C diminue jusqu'à devenir nulle, tandis que celle de G continue de croître. Dans ce type de réaction, on peut ainsi éliminer l'effet de la méthylation des A et C terminaux sur la fixation des aminoacides. L'expérience a été réalisée en collaboration avec Mme BEFORT et a conduit aux résultats consignés dans le tableau XXV.

On constate, pour tous les aminoacides étudiés, une diminution importante de la fixation pour les faibles quantités de sulfate de méthyle où G, A, C sont tous les trois méthylés ; puis l'augmentation de la quantité de sulfate de méthyle dans le milieu se traduit d'abord par une restauration partielle de la fixation, suivie d'une nouvelle inhibition de cette fixation qui n'atteint cependant pas l'inhibition importante observée pour les faibles méthylations. La diminution de l'inhibition de la fixation des aminoacides observée intermédiairement est

Tableau XXV

VARIATION DE LA CAPACITE ACCEPTRICE DES tRNA EN FONCTION DE LEUR TAUX DE METHYLATION

		tRNA Pourcentage de fixation par rapport au témoin		
		1	2	3
Taux de méthylation	MeG	8,4	10,9	16,9
	MeA	8,8	12,6	0
	MeC	8,1	traces	0
aminoacide				
Gly		15	77	40
Val		24	96	36
Phe		24	63	34
Lys		11	51	30
Ile		11	66	29
Thr		29	79	48

La méthylation des tRNA a été effectuée en milieu DMF.

à mettre en rapport avec la diminution de la méthylation de A et de C. L'augmentation ultérieure de cette inhibition, malgré la non-méthylation de A et C, est attribuable à l'augmentation du taux de 7-méthylguanine et probablement davantage à l'altération de la configuration du tRNA observée en milieu DMF.

II. INFLUENCE DE L'ALLYLATION SUR LA CAPACITE ACCEPTRICE DU tRNA

L'avantage de la réaction d'allylation, effectuée dans les conditions décrites, est qu'elle ne modifie que la guanine (et éventuellement

l'inosine), ce qui élimine toute interférence due à la modification du triplet pCpCpA terminal. Par contre, la réaction d'allylation présente, par rapport à la méthylation,un inconvénient important : elle n'est possible qu'en milieu organique, ce qui entraîne des risques de détérioration de la structure secondaire beaucoup plus grands. L'altération des courbes de fusion des tRNA sous l'effet de l'allylation confirme cette déstabilisation de la structure secondaire.

Il ne fallait donc pas s'attendre à des résultats facilement interprétables quant à la connaissance du site spécifique de la capacité acceptrice des aminoacides. Nous avons cependant effectué l'expérience qui nous a permis de dégager un résultat intéressant. L'influence de l'allylation à 37 et à 50° sur la capacité des tRNA de fixer spécifiquement les aminoacides est indiquée dans le tableau XXVI. Une autre expérience effectuée à 4°, non mentionnée dans le tableau, a donné des résultats parallèles.

On constate une décroissance de la capacité acceptrice qui diffère pour les divers aminoacides. Quelle que soit la température à laquelle la réaction d'allylation a été effectuée (4°, 37° ou 50°), on observe que l'ordre de croissance de la fixation des différents aminoacides est celui indiqué dans le tableau XXVII.

Un travail analogue avait déjà été effectué dans notre laboratoire pour diverses réactions d'halogénation (chloruration , bromuration, ioduration - voir DUVAL, 1967) ; un des résultats surprenants de cette étude était que la chute de la fixation des divers aminoacides sur les tRNA halogénés était comparable quelle que soit la réaction d'halogénation, quoique les bases modifiées dans chacune des réactions d'halogénation ne soient pas identiques. L'ordre de décroissance de la fixation des aminoacides est indiqué dans le tableau XXVII. Si l'on compare les résultats de la réaction d'allylation et des réactions d'halogénation,

Tableau XXVI

VARIATION DE LA CAPACITE ACCEPTRICE DES tRNA
EN FONCTION DE LEUR TAUX D'ALLYLATION

	Pourcentages de modification par rapport au témoin					
	allylation 1 h 30 à 37°			allylation 15 min à 50°		
Bromure d'allyle/P	25	50	100	25	200	500
aminoacide						
Phe	76	45	36			
Asn	59	35	25			
Arg	50	35	28			
Met	43	30	29			
Ser	42	24	16			
Lys	39	31	26	65	41	35
Ile	36	30	24			
Leu	36	27	22	63	48	31
Pro				55	49	23
Gly	37	32	27	46	27	22
Gln	28	20	19			
Glu	17	14	12			

Tableau XXVII

ORDRE DE DECROISSANCE DE LA CAPACITE DE FIXATION DE CERTAINS AMINOACIDES SOUS L'INFLUENCE DE DIVERSES MODIFICATIONS DES tRNA

Allylation													
4° - 60 h	Phe		Arg		Val		Lys						
37° - 1 h 30	Phe	Asn	Arg	Met		Ser	Lys	Ile	Leu	Pro	Gly	Gln	Glu
50° - 15 min	Phe				Val	Ser			Leu	Pro	Gly		
Halogénation	Phe	Arg	Asn		Val		Lys	Gly	Pro	Leu		Gln	Glu
Proflavine*	Val	Asn	Gly*		Phe	Arg	**Lys**		**Pro**	**Gly****	Gln	Glu	Leu
Bromure d'éthidium**													

on est frappé de constater que cet ordre est,à peu de choses près,le même dans les deux types de réaction : par exemple la phénylalanine, l'arginine et l'acide aspartique se trouvent toujours parmi les aminoacides dont la fixation est la moins affectée, tandis que la proline, la glutamine et l'acide glutamique sont toujours parmi ceux dont la fixation est la plus affectée.

Il apparaît que des réactions très différentes conduisent, lorsqu'elles sont effectuées en milieu DMF, à des résultats comparables. Ce phénomène ne peut s'interpréter que par l'atteinte d'une caractéristique commune. Ceci pourrait par exemple être, dans toutes les réactions étudiées, la modification d'une base mineure présente dans le dernier groupe de tRNA et absente dans le premier. Mais, il est plus logique de penser à l'atteinte d'un autre facteur, la configuration des tRNA. Des résultats récents de Mme BEFORT, effectués en collaboration avec Mr. WERENNE (1968) apportent un argument sérieux à cette interprétation. Ces auteurs ont, en effet, montré que l'addition au tRNA de proflavine ou de bromure d'éthidium, composés produisant une altération de la configuration des tRNA en s'intercalant entre les plateaux de bases, conduisait à une baisse de la fixation des aminoacides dans un ordre présentant quelques analogies avec celui donné par les réactions d'allylation et d'halogénation : on constate, par exemple, que la proline, la glutamine et l'acide glutamique sont une fois de plus les aminoacides dont la fixation sur les tRNA est la plus diminuée.

Il résulte de cette étude comparative que la chute de la capacité acceptrice observée après allylation des tRNA est moins la conséquence d'une atteinte spécifique de certaines bases que d'une modification, plus ou moins facile suivant les tRNA étudiés, de la configuration de ces tRNA. Il semblerait que chez certains tRNA la structure secondaire ou tertiaire soit plus aisément restaurée,après action de ces réactifs que

chez d'autres tRNA. Il est à remarquer que le $tRNA^{Phe}$ est l'un des tRNA dont la capacité acceptrice semble la moins affectée sous l'influence des diverses modifications. Si l'interprétation que nous donnons du phénomène est correcte, cette observation pourrait signifier que ce tRNA possède une configuration particulièrement résistante. Ceci est en accord avec les expériences de DIMITREVIEZ, GRUNBERG-MANAGO et DIRHEIMER (1968) qui ont observé la très grande résistance du $tRNA^{Phe}$ à l'action d'une endonucléase de rein de mouton qui coupe, vraisemblablement de façon spécifique, les zones en simple brin et avec nos propres expériences de méthylation, exposées dans le chapitre précédent, qui ont mis en évidence l'accessibilité très faible de ce tRNA au réactif méthylant.

CONCLUSION

Il résulte de l'étude de l'influence des réactions d'alcoylation sur la capacité acceptrice des tRNA que cette approche ne permet pas d'obtenir des renseignements valables sur les sites qui sont reconnus, dans cette molécule, par les aminoacyl-tRNA synthétases. Dans le cas de la méthylation, réalisable en milieu aqueux, dans des conditions laissant apparemment intactes les structures secondaire et tertiaire, on est gêné par la modification des bases du triplet pCpCpA terminal. Dans le cas de l'allylation, réalisable seulement en milieu organique, l'interprétation des résultats est rendue difficile par la déstabilisation de la configuration du tRNA dans ce milieu.

L'emploi de réactifs alcoylants en milieu organique a cependant permis de dégager un résultat intéressant : il semble que la structure secondaire ou tertiaire se restaure, après action de ces réactifs, plus facilement chez certains tRNA que chez d'autres.

D'autres travaux, dans notre propre laboratoire ou dans d'autres laboratoires, avec d'autres modifications, ont abouti à la même conclusion.

Nous pensons que la technique des modifications chimiques, et en particulier la technique de méthylation en milieu aqueux et en présence de Mg^{++}, permettra néanmoins d'obtenir des informations sur les sites impliqués dans la reconnaissance par les aminoacyl-tRNA synthétases, à condition cependant d'utiliser une approche différente. Dans le précédent chapitre, nous avons commencé l'étude des sites accessibles à la méthylation dans la molécule de $tRNA^{Phe}$. On sait, par ailleurs,que les tRNA sont capables de former avec les aminoacyl-tRNA synthétases correspondantes des complexes qu'il est possible d'isoler par ultracentrifugation (YANIV, 1968), par filtration sur millipore (YARUS et BERG, 1967), par électrophorèse (SEIFERT, NASS et ZILLIG, 1968 ; OKAMOTO et KAWADE, 1967) ou encore par chromatographie sur Sephadex (LAGERKVIST, RYMO et WALDENSTRÖM, 1966). Dans de tels complexes, certaines régions du tRNA qui étaient précédemment accessibles à la méthylation, devraient cesser de l'être si toutefois le complexe est suffisamment stable. C'est dans cette voie que nous nous proposons de nous engager en collaboration avec Mme BEFORT, notre travail sur la méthylation du $tRNA^{Phe}$ représentant la première étape de cette nouvelle approche.

CHAPITRE VIII

INHIBITION DE LA MULTIPLICATION VIRALE A L'AIDE D'ACIDES RIBONUCLEIQUES ALCOYLES

INTRODUCTION

Cette partie de notre travail représente notre contribution à une étude effectuée à la Division de Microbiologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées à Lyon par MM. COLOBERT et LOUISOT.

Rappelons que les organismes animaux ou les cellules animales en survie ou en culture produisent, après infection par un virus, des substances inhibitrices du cycle de la multiplication virale. Les mécanismes d'action de ces composés sont variés. Les produits décrits sous le nom d'interférons (ISSACS et LINDENMANN, 1957) appartiennent à cette catégorie d'inhibiteurs. HENLE et PAUCKER (1958) et PAUCKER et HENLE (1958) ont montré que l'acide nucléique viral seul suffit à provoquer chez l'hôte ces réactions, sans que soit nécessaire la présence de la totalité du virion. La formation d'interféron ou de substance analogue peut être induite chez l'hôte non seulement par un acide nucléique viral, mais encore par des acides nucléiques étrangers, non viraux, provenant de cellules d'espèces animales, végétales ou bactériennes très différentes de l'espèce hôte (RNA hétérologue) (ISSACS, 1961 ; ROTEM, COX et ISAACS, 1963). Nous avons recherché si des RNA homologues à ceux des cellules réceptrices, mais chimiquement modifiés, se comportaient comme des RNA étrangers et inhibaient le développement viral.

ISAACS (1963) avait déjà observé qu'un RNA homologue, préalablement traité par l'acide nitreux, provoquait une certaine inhibition virale.

Le présent travail a eu pour but d'étudier l'effet des RNA méthylés ou allylés. Les systèmes cellulaires utilisés étaient constitués par du cortex rénal de veau ou par des fibroblastes d'embryons de poulet. Les virus "révélateurs" appartenaient à la famille des Myxovirus ou à celle des Arbovirus.

A. TECHNIQUES

I. TECHNIQUES VIROLOGIQUES

Les techniques utilisées concernant la préparation du virus, la culture cellulaire, l'introduction des acides nucléiques protecteurs, l'inoculation du virus et le titrage du virus produit ainsi que les mesures de respiration cellulaire ont été décrites par LOUISOT et coll. (1968 a et b).

Dans un premier temps, le matériel utilisé a été une culture de cellules de cortex rénal de veau, les acides nucléiques ajoutés provenant soit du cortex de rein de veau (RNA homologue), soit de levure de boulangerie Saccharomyces cerevisiae (RNA hétérologue) ; l'infection virale était due au Myxovirus parainfluenzae I (virus Sendaï). Par la suite, un autre système a été également employé, constitué par des fibroblastes d'embryons de poulet infectés, un Arbovirus du type A (virus Sindbis) ; dans ce cas, les acides nucléiques ajoutés étaient extraits soit des embryons de poulet, soit de la levure.

II. PREPARATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

1) Acide ribonucléique de levure

La préparation du RNA de levure a été effectuée selon la technique décrite au chapitre I.

2) Acide ribonucléique cytoplasmique du cortex rénal de veau

L'extraction du RNA de rein de veau a nécessité une mise au point que nous avons réalisée avec la collaboration de MM. J. P. BECK et G. KEITH.

Le prélèvement des reins de veau est effectué le plus rapidement possible après l'abattage des animaux (15 à 20 minutes au maximum). Les téguments sont éliminés et les reins, coupés en morceaux pour en accélérer le refroidissement, sont immédiatement placés dans la carboglace pour le transport au laboratoire. Toutes les opérations ultérieures sont effectuées à 4°.

Après décongélation dans une solution de saccharose (saccharose 0,25 M - $CaCl_2$ $3,3 \cdot 10^{-3}$ M - polyvinylsulfate de potassium 50 µg/ml), les reins sont découpés, la graisse et le tissu conjonctif étant soigneusement éliminés. Le broyage est alors effectué dans la solution de saccharose précédente (50 ml pour 15 g de tissu) avec un appareil VIRTIS, puis dans un appareil POTTER en teflon (jeu de 0,15 mm). L'homogénat obtenu est filtré sur 4 couches de gaze.

Les noyaux et les débris cellulaires sont écartés par une centrifugation à 2 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est prélevé par succion ; son volume est amené à 100 ml avec le tampon suivant :

acétate de sodium	0,05 M
NaCl	0,15 M
dodécylsulfate de sodium	0,3 p. 100
polyvinylsulfate de potassium	50 µg/ml

Le pH du tampon est ajusté à 5.

Les extractions de RNA sont effectuées par le phénol saturé avec ce même tampon. Une première extraction est effectuée par 1 volume de phénol pendant 30 minutes à 4°. Le mélange est centrifugé ; la phase aqueuse et la phase intermédiaire sont prélevées en vue d'une

nouvelle extraction par un volume égal de phénol. La phase aqueuse est traitée une troisième fois par un demi-volume de phénol. La phase aqueuse obtenue après la dernière centrifugation est additionnée d'acétate de potassium (2 p. 100). Le RNA est précipité par 2 volumes d'éthanol. Après centrifugation et redissolution du précipité, le RNA est précipité une deuxième fois par l'éthanol en présence d'acétate de potassium. On centrifuge ; le précipité obtenu est redissous dans NaCl 10^{-3} M et dialysé contre de l'eau avant d'être lyophilisé.

Il faut particulièrement insister sur la nécessité de travailler dans les délais les plus courts si l'on veut obtenir un RNA dont le profil de sédimentation en gradient de saccharose ne soit pas celui d'un RNA trop dégradé.

3) Acide ribonucléique d'embryon de poulet

Les acides ribonucléiques d'embryon de poulet ont été préparés par Mme G. BECK selon la méthode qu'elle a mise au point et qui est relatée par LOUISOT et coll. (1968 b).

III. TECHNIQUES D'ALCOYLATION

1) Méthylation

Les RNA dissous dans l'acétate de potassium 0,4 M ont été traités par le sulfate de méthyle selon la technique déjà décrite à raison de 2, 4 ou 6 moles de sulfate de méthyle par nucléotide dans le milieu réactionnel pendant 22 heures à 4°. L'analyse chromatographique des RNA méthylés a donné les résultats suivants : pour 2 moles de sulfate de méthyle par nucléotide dans le milieu réactionnel (RNA "2-méthylé") :
10 p. 100 de 7-méthylguanine, traces de 1-méthyladénine, uracile et cytosine non touchés ; pour 4 moles de sulfate de méthyle par nucléotide

(RNA "4-méthylé") : 15 à 25 p. 100 de 7-méthylguanine, 5 à 12 p. 100 de 1-méthyladénine, traces de 3-méthylcytosine, uracile non touché ; pour 6 moles de sulfate de méthyle par nucléotide (RNA"6-méthylé") : 20 à 30 p. 100 de 7-méthylguanine, 10 à 15 p. 100 de 1-méthyladénine, traces de 3-méthylcytosine, uracile non touché.

2) Allylation

Les RNA, allylés selon la technique décrite dans le chapitre IV, contenaient en moyenne 8 p. 100 des résidus guanine modifiés (traitement par 50 moles de bromure d'allyle par nucléotide dans le milieu réactionnel).

B. RESULTATS

I. INHIBITION DE LA MULTIPLICATION DE MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I (VIRUS SENDAÏ) SUR CELLULES DE REIN DE VEAU

Les résultats sont consignés dans le tableau XXVIII.

1) Action de l'acide ribonucléique homologue sur la multiplication virale

Les résultats montrent que le RNA cytoslasmique total des cellules du cortex rénal de veau, homologue des cellules réceptrices, mis au contact du tapis cellulaire pendant 1 heure à 37°, ne modifie pas le taux de multiplication du virus Sendaï ultérieurement inoculé. Le même résultat est obtenu si ce RNA a été préparé dans des conditions moins rigoureuses conduisant à une dégradation partielle.

Tableau XXVIII

INHIBITION DE LA MULTIPLICATION DE MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE I, (SOUCHE SENDAÏ) SUR CELLULES DE REIN DE VEAU EN PRESENCE DE LA MÊME CONCENTRATION INITIALE DE DIVERS RNA

RNA éprouvé à la concentration de 100 µg/ml	Inhibition *
RNA homologue natif	0 à 4
RNA homologue dégradé	0 à 3
RNA homologue "2-méthylé"	33
RNA homologue "4-méthylé"	87 à 100
RNA hétérologue natif (RNA total de levure)	36
RNA hétérologue dégradé (RNA total de levure)	35
RNA hétérologue "6-méthylé" (RNA total de levure)	36

* exprimée en pourcentage de la multiplication virale normale sur cellules non traitées.

2) Action d'un acide ribonucléique hétérologue

Le RNA total de levure, mis au contact des cellules-hôtes pendant le même temps (1 h à 37°), entraîne une inhibition marquée mais non totale de la multiplication virale. Cette inhibition se manifeste de façon de plus en plus nette jusqu'à une concentration de 200 µg/ml au-delà de laquelle on n'observe pas de meilleure protection. Des résultats tout à fait comparables sont obtenus avec du RNA total de levure partiellement dégradé (de constante de sédimentation comprise entre 3 et 8 S).

3) Action d'un acide ribonucléique ribosomal hétérologue méthylé

Le RNA total de levure "6-méthylé" (voir technique de méthylation) entraîne l'apparition d'une inhibition équivalente à celle obtenue sous l'effet du même RNA hétérologue non méthylé, employé aux mêmes concentrations.

4) Action de l'acide ribonucléique homologue méthylé

Le RNA total de rein de veau "2-méthylé" entraîne une inhibition de la multiplication virale qui n'est pas totale, même pour de fortes concentrations en RNA méthylé. Par contre, le même RNA homologue "4-méthylé" provoque une inhibition très nette du développement viral. Pour des concentrations de ce RNA supérieures ou égales à 70 µg/ml, l'inhibition de la multiplication virale est quasi totale.

II. INHIBITION DE LA MULTIPLICATION D'UN ARBOVIRUS (VIRUS SINDBIS) SUR FIBROBLASTES D'EMBRYON DE POULET

Les résultats sont consignés dans le tableau XXIX.

1) Action de l'acide ribonucléique homologue

Le RNA total extrait des embryons de poulet ne modifie pas le taux de multiplication de virus Sindbis ultérieurement inoculé sur des cellules d'embryon de poulet appartenant à la même souche.

2) Action d'un acide ribonucléique hétérologue

Des tRNA totaux, extraits dans les mêmes conditions à partir du cortex rénal de veau ou de mouton, de même que le RNA total de levure mis au contact des cellules d'embryon de poulet à des

Tableau XXIX

INHIBITION DE LA MULTIPLICATION DU VIRUS SINDBIS (SOUCHE AR 339) SUR FIBROBLASTES D'EMBRYON DE POULET, OBSERVEE EN PRESENCE DE DIVERS CONSTITUANTS DE RNA

Produits éprouvés	Inhibition * 100 µg/ml	200 µg/ml
RNA homologue	0	0
RNA homologue "4-méthylé"	86	92
RNA homologue "4-méthylé"-Fraction 28 S	90	95
RNA homologue "4-méthylé"-Fraction 18 S	95	99
RNA homologue "4-méthylé"-Fraction 4 S	99	99
RNA homologue allylé	89	94
RNA hétérologue (RNA de levure)	25	40
RNA hétérologue (RNA de cortex rénal de veau)	32	50
RNA hétérologue (RNA de cortex rénal de mouton)	32	40
RNA hétérologue "4-méthylé" (RNA de cortex rénal de mouton)	32	40
7-méthylguanine	0	0

* exprimée en pourcentage de la multiplication virale normale sur cellules non traitées et observée avec deux concentrations initiales de RNA.

concentrations comprises entre 6 et 400 µg/ml, entraînent une inhibition de la multiplication du virus Sindbis. Cette inhibition ne dépasse cependans pas un taux de 50 p. 100.

3) Action d'un acide ribonucléique hétérologue méthylé

La méthylation du RNA (RNA de rein de mouton "4-méthylé") entraîne, à des concentrations comprises entre 3 et 320 µg/ml, une inhibition de la multiplication virale identique à celle résultant de l'emploi du même RNA hétérologue non modifié.

4) Action de l'acide ribonucléique total homologue méthylé

Avec le RNA total d'embryon de poulet "4-méthylé", on observe une inhibition quasi totale pour une concentration de 100 µg/ml. L'emploi de RNA homologue méthylé à des taux variables ("2-, 4- ou 6-méthylé") n'a pas permis d'observer des différences significatives.

5) Action de différentes fractions de l'acide ribonucléique homologue méthylé

Les fractions 28, 18 et 4 S du RNA d'embryon de poulet, obtenues par centrifugation en gradient de saccharose et méthylées ("4-méthylées") ont présenté un pouvoir inhibiteur comparable à celui du RNA total méthylé.

6) Action de la 7-méthylguanine

Etant donné que le dérivé méthylé le plus abondant est la 7-méthylguanine, le pouvoir inhibiteur de ce composé à l'état libre a été étudié pour des concentrations allant de 20 à 320 µg/ml. Dans tous les cas, aucune inhibition de la multiplication du virus Sindbis sur les cellules d'embryon de poulet n'a été observée.

7) Action de l'acide ribonucléique homologue allylé

Les inhibitions obtenues avec le RNA allylé ont été identiques à celles trouvées avec le RNA "4-méthylé".

C. DISCUSSION

L'inhibition de la multiplication virale sous l'influence des RNA alcoylés a été étudiée dans deux systèmes : le système Myxovirus Parainfluenzae I - cellules du cortex rénal de veau et le système virus Sindbis - fibroblastes d'embryon de poulet. Dans le premier système, le titrage du virus était effectué sur un tissu (embryon de poulet de 9 jours) différent de celui utilisé pour le développement viral (cellules du cortex rénal de veau). Dans le deuxième système, toutes les opérations ont été effectuées avec des cellules d'embryon de poulet.

Les résultats obtenus avec ces deux systèmes sont convergents. On remarque d'abord que le RNA homologue de la cellule réceptrice ne possède aucun pouvoir inhibiteur de la multiplication virale. Signalons cependant ici, un résultat intéressant observé par LOUISOT et coll. (1968 b) : une différence de souche dans les embryons de poulet utilisés pour la préparation des RNA d'une part et, d'autre part, pour la culture cellulaire, suffit à conférer au RNA inducteur un pouvoir inhibiteur marqué. Il semble donc que des différences apparaissent déjà dans ce dernier cas entre RNA de même espèce mais de souches différentes.

L'emploi de RNA d'espèce hétérologue à la cellule hôte induit un pouvoir inhibiteur. Cependant, celui-ci demeure partiel, il ne dépasse pas 50 p. 100.

Lorsqu'un RNA hétérologue est préalablement modifié par méthylation, le pouvoir inhibiteur qu'il induit n'est pas supérieur à celui

du même RNA non modifié. La méthylation ne semble donc pas renforcer le caractère "étranger" du RNA hétérologue.

Par contre, la méthylation des RNA homologues conduit à un produit qui inhibe la multiplication virale de 85 à 100 p. 100.

Dans le cas du système Myxovirus parainfluenzae I -cellules du cortex rénal de veau, on observe que l'inhibition de la multiplication virale dépend du taux de méthylation : à concentration identique, le RNA homologue "4-méthylé" est plus efficace que le RNA "2-méthylé". Dans le cas du système virus Sindbis - fibroblastes d'embryon de poulet, cette influence du taux de méthylation n'a pas été retrouvée : les taux d'inhibition de la multiplication virale ne diffèrent pas d'une manière significative lorsqu'on emploie les RNA homologues "2-, 4- ou 6-méthylés". Les résultats du tableau XXIX montrent également qu'aucune différence dans le pouvoir inhibiteur n'a été observée avec les produits de méthylation des deux constituants du RNA ribosomal, ni avec les RNA de transfert. Comme par ailleurs, les résultats du tableau XXVIII montrent que la dégradation partielle du RNA n'entraîne pas de différences dans ses propriétés inhibitrices, on peut en conclure que le pouvoir inhibiteur observé avec les RNA méthylés n'est lié ni à une classe particulière de ces RNA (RNA ribosomal ou de transfert), ni à leur complète intégrité. Il serait intéressant de déterminer à partir de quelle longueur de chaîne apparaît le pouvoir inhibiteur des polyribonucléotides méthylés.

Le composé principal méthylé, formé lors de l'action du sulfate de méthyle sur le RNA, est la 7-méthylguanine. Les résultats du tableau XXIX montrent que cette dernière n'induit par elle-même aucun pouvoir inhibiteur de la multiplication virale.

L'inhibition de la multiplication virale n'est pas spécifique des RNA méthylés. La deuxième réaction d'alcoylation que nous avons étudiée dans ce travail, l'allylation, conduit à l'obtention d'un RNA allylé qui présente un pouvoir inhibiteur identique à celui du RNA méthylé.

Signalons que d'autres RNA chimiquement modifiés ont été étudiés sous l'angle de l'induction d'un pouvoir inhibiteur du développement viral (EBEL et coll., 1968 ; LOUISOT et coll., 1968 a). Ces travaux ont montré que la bromuration conférait également au RNA un pouvoir inhibiteur quoique nettement inférieur à celui des RNA alcoylés. Par contre, l'acétylation des RNA, ainsi que leur désamination par l'acide nitreux, conduit à des taux d'inhibition comparables à ceux des RNA alcoylés.

Il apparaît donc à la suite de tous ces travaux qu'un grand nombre de modifications chimiques entraînent, chez les RNA homologues, la capacité d'inhiber la multiplication virale. Parmi ces modifications, la méthylation et l'allylation étudiées dans ce travail sont parmi les plus efficaces.

Quelques travaux préliminaires, relatifs au mécanisme de cette inhibition, ont été entrepris par LOUISOT et coll. (1968, a et b). Il faut d'abord signaler qu'une déprotéinisation très poussée par la méthode de SEVAG, de même que le traitement par la désoxyribonucléase, n'entraînent pratiquement aucune modification du pouvoir inhibiteur induit. Il apparaît donc que ni une protéine, ni un DNA ne sont indispensables à l'expression du pouvoir inhibiteur. Si ces contaminants existent, leur rôle apparaît négligeable devant celui du RNA homologue, chimiquement modifié. Il a été montré par LOUISOT et coll. que la résistance, partielle ou totale, acquise par les cellules sous l'influence des RNA homologues chimiquement modifiés semble due, au moins en partie, à l'existence d'une substance soluble, précipitable par le sulfate d'ammonium, non dialysable, non sédimentable à 145 000 g pendant 4 h, stable à pH acide, insensible à l'action de la ribonucléase, sensible à l'action de la trypsine, ensemble de propriétés propres aux composés de nature protéique du type interféron. Il est cependant possible que la production de cette substance ne représente qu'un des aspects du mécanisme réactionnel dans son ensemble, comme tendrait à le suggérer l'indépendance relative du système de protection à l'égard de l'actinomycine (LOUISOT, 1968).

RESUME ET CONCLUSION

Ce travail représente une contribution à l'étude des alcoylations des acides ribonucléiques. Il s'intègre dans le cadre plus général de l'application de la technique des modifications chimiques des RNA à l'étude des relations entre la structure et l'activité de ces molécules.

Dans la première partie, nous décrivons les techniques principales employées dans notre travail, en particulier la mise au point de l'isolement du tRNA de levure de bière spécifique de la phénylalanine ($tRNA^{Phe}$) par distribution en contre-courant.

La deuxième partie a pour objet l'étude chimique et physicochimique des RNA soumis à deux réactions d'alcoylation : la méthylation et l'allylation.

La méthylation des RNA a été effectuée par le sulfate de méthyle en milieu aqueux (acétate de potassium 0,4 M) ou en milieu organique (diméthylformamide). L'étude chimique, dans différentes conditions expérimentales, nous a permis de montrer que les bases méthylées sont qualitativement les mêmes en milieu aqueux ou organique, mais que les pourcentages de modification de chaque base évoluent de façon différente dans les deux solvants. On obtient la 7-méthylguanine, la 1-méthyladénine et la 3-méthylcytosine, ces deux dernières en plus faible proportion. L'uracile reste intact. En milieu acétate de potassium, les taux de bases modifiées sont beaucoup plus élevés qu'en milieu diméthylformamide.

Des études physicochimiques nous ont permis de montrer que les RNA étaient progressivement dégradés par la réaction de méthylation effectuée en milieu organique, tandis que leur structure était bien

conservée au cours de la modification en milieu aqueux. Dans le cas des tRNA, nous avons effectué une étude de l'effet de la méthylation sur la structure secondaire : celle-ci est progressivement altérée. Mais, en milieu aqueux, jusqu'à un taux de modification des résidus guanine de 25 p. 100, cette altération est très peu sensible. Ceci suggère une attaque préférentielle dans les boucles, les zones en double hélice étant préservées.

Les expériences d'allylation ont été effectuées avec le bromure d'allyle, en milieu aqueux ou en milieu diméthylformamide. Une étude préliminaire a été réalisée sur les nucléosides dans le but de déceler les dérivés susceptibles de se former et de les localiser en chromatographie sur papier. La réaction d'allylation conduit à la modification spécifique de la guanine dans les RNA. Elle n'est possible qu'en milieu diméthylformamide ; dans nos conditions expérimentales, elle n'atteint au maximum que 30 p. 100 des résidus guanine.

Au fur et à mesure que le taux d'allylation augmente, on observe une dégradation progressive de la chaîne polynucléotidique des RNA, assez comparable à celle constatée pour la méthylation. Dans le cas des tRNA, la dégradation ne devient sensible que pour des taux de modification élevés. La structure secondaire des tRNA est également affectée par l'allylation.

Cette réaction revêt cependant un caractère intéressant par sa spécificité pour une seule base.

Dans la troisième partie, nous avons envisagé les applications de la méthylation et de l'allylation à l'étude structurale des RNA. Dans un but de détermination des structures primaires, nous avons recherché si l'action de la ribonucléase T_1, qui hydrolyse spécifiquement les liaisons guanylyl-(3'-5')-nucléosides en guanosine-3'-phosphates, était la même après alcoylation en N_7 de la guanine.

L'efficacité de la ribonucléase T_1 a été testée par dosage du phosphore libéré par action conjuguée de cet enzyme et de la phosphatase alcaline d'E. coli. Nous avons constaté un parallélisme entre le taux d'alcoylation (méthylation ou allylation) des résidus guanine et la diminution du phosphate libéré par la double action enzymatique. Cette étude a été effectuée aussi bien sur des guanylyl-(3'-5')-nucléosides que sur des RNA (tRNA de levure). La possibilité de coupures avec la formation de phosphates cycliques non attaqués par la phosphatase a été écartée par diverses études chromatographiques des produits d'hydrolyse de la ribonucléase T_1.

L'alcoylation de la guanine empêche donc l'action de la ribonucléase T_1. Cette propriété est particulièrement intéressante dans les études de structure, car elle permet l'obtention d'oligonucléotides de longueur de chaîne plus grande par action de la ribonucléase T_1. Les résultats sont plus facilement interprétables dans le cas de l'allylation que dans le cas de la méthylation, car l'allylation a l'avantage de ne toucher aucune autre base que la guanine.

A la lumière des résultats des études précédentes, nous avons effectué la modification d'un tRNA spécifique ($tRNA^{Phe}$) par action du sulfate de méthyle en milieu acétate de potassium 0,4 M en présence de Mg^{++}. Par hydrolyse totale par la ribonucléase T_1 suivie de la chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose des oligonucléotides obtenus, nous pouvons espérer déterminer les sites de la molécule les plus accessibles et voir si nos résultats sont compatibles avec la structure en feuille de trèfle généralement admise à l'heure actuelle pour les tRNA.

Pour que l'interprétation soit plus claire, nous avons utilisé le sulfate de méthyle marqué au ^{14}C ou avec ^{3}H. Nous avons ainsi constaté une disparition de certains pics absorbants dans l'UV et l'augmentation de quelques autres, ainsi que l'apparition de pics de radioactivité.

Le problème est cependant compliqué du fait de la méthylation de A et C dans le triplet terminal. En présence de Mg^{++}, le $tRNA^{Phe}$ ne fixe qu'un très petit nombre de groupes $-CH_3$, localisés dans quelques régions bien définies. Nos observations sont en faveur d'une attaque préférentielle de la région 3'-terminale, de celle de l'anticodon et de la boucle riche en dihydrouracile. Par contre, la zone TpΨpCpGp paraît bien protégée. Ces résultats sont en accord avec ceux de divers auteurs, obtenus avec d'autres tRNA et des modifications différentes.

La quatrième partie traite de l'application de la méthylation et de l'allylation à l'étude de certaines activités biologiques des RNA.

La méthylation des tRNA en milieu DMF conduit à une chute de la capacité acceptrice qui paraît liée en grande partie à la méthylation du triplet terminal. Dans le cas de l'allylation, on observe également, avec la modification progressive des résidus guanine, des diminutions de cette activité différentes d'un aminoacide à l'autre. Mais il est difficile d'attribuer cette différence d'activité à l'atteinte d'un site spécifique pour la fixation des aminoacides, étant donné l'altération rapide de la structure secondaire au cours de l'allylation.

Les résultats sont discutés en fonction de ceux observés pour des tRNA traités avec d'autres agents chimiques. Un parallélisme assez remarquable entre les conséquences de modifications très différentes sur la capacité acceptrice des tRNA suggère que la diminution de celle-ci est surtout la conséquence d'une désorganisation de la structure secondaire et tertiaire, et que certains tRNA sont moins bien restaurés que d'autres après ces traitements.

L'alcoylation des RNA a trouvé une autre application intéressante. Dans un travail en collaboration avec MM. COLOBERT et LOUISOT, il a été montré que l'addition de RNA homologues méthylés

et allylés à des cellules en culture (cellules de rein de veau ou d'embryon de poulet) inhibait chez ces dernières la multiplication de divers virus (Myxovirus et Arbovirus). L'addition de RNA homologue non alcoylé est sans effet. L'addition de RNA hétérologues (RNA de levure), méthylés ou non, produit également une inhibition, mais moins prononcée. L'apparition de substances interférentes a pu être mise en évidence, consécutivement à l'addition des RNA méthylés.

B I B L I O G R A P H I E

ABSHIRE, C.J. et BERLINGUET, L. (1964) Canad. J. Chem., 42, 1599.

ADAMS, A., LINDAHL, T. et FRESCO, J. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 57, 1684.

AMES, B.N. et DUBIN, D.T. (1960) J. Biol. Chem., 235, 769.

APGAR, J., HOLLEY, R.W. et MERRILL, S.H. (1962) J. Biol. Chem., 237, 796.

ARCA, M., CALVORI, C., FRONTALI, L. et TECCE, G. (1964) Biochim. Biophys. Acta, 87, 440.

ARCA, M., CALVORI, C., FRONTALI, L. et TECCE, G. (1967) Biochim. Biophys. Acta, 145, 284.

ARMSTRONG, A., HAGOPIAN, H., INGRAM, V.M. et WAGNER, E.K., (1966) Biochemistry, 5, 3027.

AUBEL-SADRON, G., BECK, G. et EBEL, J.P. (1961) Biochim.Biophys. Acta, 53, 11.

AUGUSTI-TOCCO, G. et BROWN, G.L. (1965) Nature, 206, 683.

BAEV, A.A., VENKSTERN, T.V., MIRZABEKOV, A.D., KRUTILINA, A.I., AXELROD, V.A., LI, L. et ENGELHARDT, V.A. (1966) Third Symp. Fed. Europ. Biol. Soc., Varsovie.

BAEV, A.A., FODOR, I., MIRZABEKOV, A.D., AXELROD, V.D. et KASARINOVA, L. Ya. (1967) Molekulyarnaya Biologiya, 1, 859.

BAKES, J., DIRHEIMER, G. et BRAHMS, J. (1968) en préparation.

BALDWIN, R.C. (1954) J. Phys. Chem., 58, 1081.

BECK, G., DUVAL, J., AUBEL-SADRON, G. et EBEL, J.P. (1966) Bull. Soc. Chim. Biol., 48, 1205.

BECK, G., BECK, J.P. et EBEL, J.P. (1968) Bull. Soc. Chim. Biol., sous presse .

BEFORT, N. (1968) résultats non publiés .

BEFORT, N., KEITH, G. et EBEL, J.P. (1968) en préparation .

BOLLACK, C. et EBEL, J.P. (1968) IX^{e} Journées Biochimiques Latines Monaco, 24 - 28 avril.

BOLLACK, C. , KEITH, G. et EBEL, J. P. (1965) Bull. Soc. Chim.Biol., 47, 765.

BRAHMS, J. (1968) J. Chim. Phys., 65, 105.

BREDERECK, H. (1947) Ber., 80, 401.

BREDERECK, H., HAAS, H. et MARTINI, A. (1948) Ber., 81, 307.

BRIGGS, A. P. (1922) J. Biol. Chem., 53, 13.

BRIMACOMBE, R. L. C., GRIFFIN, B. E., HAINES, J. A., HASLAM, W. J. et REESE, C. B. (1965) Biochemistry, 4, 2452.

BROOKES, P. et LAWLEY, P. D. (1960) J. Chem. Soc., 539.

BROOKES, P. et LAWLEY, P. D. (1961a) J. Chem. Soc., 3923.

BROOKES, P. et LAWLEY, P. D. (1961b) Biochem. J., 80, 496.

BROOKES, P. et LAWLEY, P. D. (1962) J. Chem. Soc., 1348.

BROOKES, P. et LAWLEY, P. D. (1963) Biochem. J., 89, 138.

BROSTOFF, S. W. et INGRAM, V. M. (1967a) Science, 158, 666.

BROSTOFF, S. W. et INGRAM, V. M. (1967b) Federation Proc., 26, 733.

BROWNLEE, G. G., SANGER, F. et BARRELL, B. G. (1967) Nature, 215, 735.

BROWNLEE, G. G., SANGER, F. et BARRELL, B. G. (1968) J. Mol. Biol., 34, 379.

CERNA, J., RYCHLIK, I. et SORM, F. (1966) Coll. Czech. Chem. Comm., 31, 336.

CHARGAFF, E. et ZAMENHOF, S. (1948) J. Biol. Chem., 173, 327.

CHEN, J. H. et DAVIS, F. F. (1965) Biochem. Biophys. Res. Comm., 20, 124.

CLARK, B. F. C., DOCTOR, B. P., HOLMES, K. C., KLUG, A., MARCKER, K. A., MORRIS, S. J. et PARADIES, H. H. (1968) Nature, 219, 1222.

CRAMER, F. (1967) Angew. Chem., 79, 653.

DENAYER, R. (1962) Bull. Soc. Chim., 1358.

DIMITREVIEZ, GRUNBERG-MANAGO, M. et DIRHEIMER, G. (1968) en préparation.

DIRHEIMER, G. et EBEL, J. P. (1967) Bull. Soc. Chim. Biol., 49, 1679.

DIRHEIMER, G. (1968) Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 1221.

DOEPNER, H., SEIDEL, H. et CRAMER, F. (1966a) Angew. Chem. 78,601.

DOEPNER, H., SEIDEL, H. et CRAMER, F. (1966b) Angew. Chem. 78,682.

DUBE, S.K., MARCKER, K.A., CLARK, B.F.C. et CORY, S. (1968) Nature, 218, 232.

DÜTTING, D. et ZACHAU, H.G. (1964) Biochim. Biophys. Acta, 91, 573.

DUVAL, J. (1964) résultats non publiés.

DUVAL, J. (1967) thèse de Doctorat ès-Sciences, Strasbourg.

DUVAL, J. et EBEL, J.P. (1965 a) Bull. Soc. Chim. Biol., 47, 787.

DUVAL, J. et EBEL, J.P. (1965 b) Bull. Soc. Chim. Biol., 47, 987.

DUVAL, J. et EBEL, J.P. (1966) C.R. Acad. Sci., série D, 263, 1773.

DUVAL, J. et EBEL, J.P. (1967) Bull. Soc. Chim. Biol., 49, 1665.

EBEL, J.P. (1968) IX^{e} Journées Biochimiques Latines Monaco - 24 - 28 avril.

EBEL, J.P., AUBEL-SADRON, G., WEIL, J.H., BECK, G. et HIRTH, L. (1965) Biochim. Biophys. Acta, 108, 30.

EBEL, J.P., WEIL, J.H., BECK, G., BOLLACK, C., COLOBERT, L. et LOUISOT, P. (1968) Biochem. Biophys. Res. Comm., 30,148.

EIGNER, J., SCHILDKRAUT, C. et DOTY, P. (1962) Biochim. Biophys. Acta, 55, 13.

ELION, G.B. (1957) The Chemistry and Biology of Purines (Ciba Foundation Symposium), J. et A. Churchill Ltd Ed., London, p. 39.

FORGET, B.G. et WEISSMAN, S.H. (1967) Science, 158, 1695.

FOX, J.J. et SHUGAR, D. (1952) Biochim. Biophys. Acta, 9, 369.

FRAENKEL-CONRAT, H. (1961) Biochim. Biophys. Acta, 49, 169.

FRESCO, J.R., ADAMS, A., ASCIONE, A., HENLEY, D. et LINDAHL, T. (1966) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31, 527.

GANGLOFF, J. et EBEL, J.P. (1968) Bull. Soc. Chim. Biol., sous presse.

GIEGE, R. et EBEL, J.P. (1968) Biochim. Biophys. Acta, 161, 125.

GIEGE, R., HEINRICH, J., WEIL, J.H. et EBEL, J.P. (1968 a) Biochim. Biophys. Acta, sous presse.

GIEGE, R., HEINRICH, J., WEIL, J.H. et EBEL, J.P. (1968 b) Biochim. Biophys. Acta, sous presse.

GLITZ, D.G., BRADLEY, A. et FRAENKEL-CONRAT, H. (1968) Biochim. Biophys. Acta, 161, 1.

GOODMAN, H.M., ABELSON, J., LANDY, A., BRENNER, S. et SMITH, J.D. (1968) Nature, 217, 1019.

GRIFFIN, B.E., HAINES, J.A. et REESE, C.B. (1967) Biochim. Biophys. Acta, 142, 536.

GROS, F., HIATT, H., GILBERT, W., KURLAND, C. RISEBROUGH, R. et WATSON, J. (1961) Nature, 190, 581.

HADDOW, A. (1956) Actes de la Conférence Internationale de Genève sur l'utilisation de l'Energie Atomique à des fins pacifiques, août 1955, Nations Unies Ed. Genève, vol. XI, p. 248.

HAINES, J.A., REESE, C.B. et TODD, A. (1962) J. Chem. Soc., 5281.

HAINES, J.A., REESE, C.B. et TODD, A. (1964) J. Chem. Soc., 1406.

HALL, R.H., ROBINS, M.J., STASIUK, J. et THEDFORD, R. (1966) J. Am. Chem. Soc., 88, 2614.

HENLE, W. et PAUCKER, K. (1958) Virology, 6, 181.

HEPPEL, L.A., HARKNESS, D.R. et HILMOE, R.J. (1962) J. Biol.Chem. 237, 841.

HO, N.W.Y. et GILHAM, P.T. (1967) Biochemistry, 6, 3632.

HOLLEY, R.W., APGAR, J., EVERETT, G.A., MADISON, J.T., MERRILL, S.H. et ZAMIR, A. (1963) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 117.

HOLLEY, R.W., APGAR, J., EVERETT, G.A., MADISON, J.T., MARQUISEE, M., MERRILL, S.H., PENSWICK J.R. et ZAMIR, A. (1965a) Science, 147, 1462.

HOLLEY, R.W., EVERETT, G.A., MADISON, J.T. et ZAMIR, A. (1965b) J. Biol. Chem., 240, 2122.

HOLY, A. et SCHEIT, K.H. (1966) Biochim. Biophys. Acta, 123, 430.

HOLY, A. et SCHEIT, K.H. (1967) Biochim. Biophys. Acta, 138, 230.

HOSKINSON, R.M. et KHORANA, H.G. (1965) J. Biol. Chem., 240, 2129.

ISAACS, A. (1961) Nature, 192, 1247.

ISAACS, A. (1963) Scient. Am., 209, 46.

ISSACS, A. et LINDENMANN, J. (1957) Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B, 147, 258.

IVANOVA, O.I., KNORRE, D.G. et MAL'YGIN, E.G. (1967) Molekularnaya Biologya, 1, 335.

JONES, J.W. et ROBINS, R.K. (1962) J. Am. Chem. Soc., 84, 1914.

JONES, J.W. et ROBINS, R.K. (1963) J. Am. Chem. Soc., 85, 193.

KAJI, H. et TANAKA, Y. (1967) Biochim. Biophys. Acta, 138, 642.

KEITH, G. et EBEL, J.P. (1968) C.R. Acad. Sci., série D, 266, 1066.

KEITH, G. et EBEL, J.P. (1968) Biochim. Biophys. Acta, 166, 16.

KOCHETKOV, N.K., BUDOWSKY, E.I., BROUDE, N.E. et KLEBANOVA, L.M. (1967) Biochim. Biophys. Acta, 134, 492.

KRIEK, E. et EMMELOT, P. (1963) Biochemistry, 2, 733.

KRIEK, E. et EMMELOT, P. (1964) Biochim. Biophys. Acta, 91, 59.

KUWANO, M., HAYASHI, Y., HAYASHI, H. et MIURA, K. (1968) J. Mol. Biol., 32, 659.

LAGERKVIST, U., RYMO, L. et WALDENSTROM, J. (1966) J. Biol. Chem. 241, 5391.

LAKE, J.A. et BEEMAN, W.W. (1968) J. Mol. Biol., 31, 115.

LAWLEY, P.D. (1966) Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Academic Press Ed., New-York and London, vol. V, p. 89.

LAWLEY, P.D. et BROOKES, P. (1961) Nature, 192, 1081.

LAWLEY, P.D. et BROOKES, P. (1963) Biochem. J., 89, 127.

LETHAM, D.S., SHANNON, J.S. et Mc DONALD, I.R. (1964) Proc. Chem. Soc., 230, 1964.

LINDAHL, T., ADAMS, A. et FRESCO, J.R. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 55, 941.

LINDAHL, T., HENLEY, D.D. et FRESCO, J.R. (1965) J. Am. Chem. Soc., 87, 4961.

LINDAHL, T., ADAMS, A., GEROCH, M. et FRESCO, J.R. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 57, 178.

LOUISOT, P. (1968) résultats non publiés.

LOUISOT, P., COLOBERT, L., BOLLACK, C., WEIL, J.H. et EBEL, J.P. (1968 a) Biochim. Biophys. Acta, 155, 38.

LOUISOT, P., COLOBERT, L., BECK, G. et EBEL, J.P. (1968 b) Ann. Inst. Pasteur, sous presse.

LOVELESS, A. (1966) Genetic and Allied Effects of Alkylating Agents, Butterworths, London.

LUDLUM, D. B. (1966a) Biochim. Biophys. Acta, 119, 630.

LUDLUM, D. B. (1966b) Mol. Pharmacol., 2, 585.

Mc CULLY, K. S. et CANTONI, G. L. (1961) Biochim. Biophys. Acta, 51, 190.

Mc ILREAVY, D. J. et MIDGLEY, J. E. M. (1967) Biochim. Biophys. Acta, 142, 47.

MADISON, J. T., EVERETT, G. A. et KUNG, H. (1966) Science, 153, 351.

MADISON, J. T. et KUNG, H. (1967) J. Biol. Chem., 242, 1324.

MARCIELLO, R. et ZUBAY, G. (1964) Biochem. Biophys. Res. Comm., 14, 272.

MARKHAM, R. et SMITH, J. D. (1951) Biochem. J., 49, 401.

MICHELSON, A. M. et GRUNBERG-MANAGO, M. (1964) Biochim. Biophys. Acta, 91, 92.

MICHELSON, A. M. et POCHON, F. (1966) Biochim. Biophys. Acta, 114, 469.

MINNEMEYER, H. J., EGGER, J. A., HOLLAND, J. F. et TIECKELMANN, H. (1961) J. Org. Chem., 26, 4425.

MINNEMEYER, H. J., TIECKELMANN, H. et HOLLAND, J. F. (1963) J. Med. Chem., 6, 602.

MIRZABEKOV, A. D., GRÜNBERGER, D., HOLY, A., BAEV, A. A. et SORM, F. (1967) Biochim. Biophys. Acta, 145, 845.

MIURA, K. (1967) Progress in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol., 6, 39.

MOMMAERTS, W. F. H. M., BRAHMS, J., WEIL, J. H. et EBEL, J. P. (1964) C. R. Acad. Sci., 258, 2687.

MONIER, R., STEPHENSON, M. L. et ZAMECNIK, P. C. (1960) Biochim. Biophys. Acta, 43, 1.

MONIER, R., NAONO, S., HAYES, D., HAYES, F. et GROS, F. (1962) J. Mol. Biol., 5, 311.

MONTGOMERY, J. A. et HEWSON, K. (1965) J. Heterocyclic Chem., 2, 313.

MONTGOMERY, J. A. et THOMAS, H. J. (1965) J. Org. Chem., 30, 3235.

NELSON, J. A., RISTOW, S. C. et HOLLEY, R. W. (1967) Biochim. Biophys. Acta, 149, 590.

NESTEROVA, N. V. (1965) Ukr. Biochem. J., 17, 906.

NISHIMURA, S. et NOVELLI, G. D. (1963) Biochem. Biophys. Res. Comm. 11, 161.

NISHIMURA, S. et NOVELLI, G. D. (1964) Biochim. Biophys. Acta, 80, 574.

OKAMOTO, T. et KAWADE, Y. (1967) Biochim. Biophys. Acta, 145, 613.

OKUMURA, F. S., ENISHI, N., ITOH, H., MASUMURA, M. et KURAISHI, S. (1959) Bull. Chem. Soc. Japan, 32, 886.

PARKER, A. J. (1962) Quart. Rev., 16, 163.

PAUCKER, K. et HENLE, W. (1958) Virology, 6, 198.

PENSWICK, J. R. et HOLLEY, R. W. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 53, 543.

PFLEIDERER, W. (1961) Liebigs Ann. Chem., 647, 167.

POCHON, F. et MICHELSON, A. M. (1967) Biochim. Biophys. Acta, 149, 99.

PULLMAN, A. et PULLMAN, B. (1962) Deoxyribonucleic Acid, Soc. Chim. Phys., Pergamon Press, London, p. 28.

RAJBHANDARY, U. L., STUART, A., FAULKNER, R. D., CHANG, S. H. et KHORANA, H. G. (1966) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31, 425.

RAJBHANDARY, U. L., CHANG, S. H., STUART, A., FAULKNER, R. D., HOSKINSON, R. M. et KHORANA, H. G. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 57, 751.

RAJBHANDARY, U. L., STUART, A. et CHANG, S. H. (1968) J. Biol. Chem. 243, 584.

REESE, C. B. et SULSTON, J. E. (1967) Biochim. Biophys. Acta, 149, 293.

REINER, B. et ZAMENHOF, S. (1957) J. Biol. Chem., 228, 457.

REMY, P., DIRHEIMER, G. et EBEL, J. P. (1967) J. Chromatog., 31, 609.

ROSS., W. C. J. (1962) Biological Alkylating Agents, Butterwoths, London.

ROTEM, Z., COX, R. A. et ISAACS, A. (1963) Nature, 197, 564.

SANGER, F., BROWNLEE, G. G. et BARRELL, B. G. (1965) J. Mol. Biol., 13, 373.

SARIN, P. S. et ZAMECNIK, P. C. (1965) Biochem. Biophys. Res. Comm., 20, 400.

SATO, K. et EGAMI, F. (1957) J. Biochem., 44, 753.

SATO-ASANO, K. et EGAMI, F. (1958) Biochim. Biophys. Acta, 29, 655.

SATO-ASANO, K. et EGAMI, F. (1960) Nature, 185, 462.

SATO-ASANO, K. et FUJII, S. (1959) J. Biochem., 46, 757.

SCANNELL, J. P., CRESTFIELD, A. M. et ALLEN, F. W. (1959) Biochim. Biophys. Acta, 32, 406.

SCHACHMAN, H. K. (1959) Ultracentrifugation in Biology, Acad. Press, Londres.

SCHEIT, K. H. et HOLY, A. (1966) Tetrahedron Letters, n° 36, 4303.

SCHEIT, K. H. et HOLY, A. (1967) Biochim. Biophys. Acta, 149, 344.

SCHULMAN, L. H. et CHAMBERS, R. W. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 61, 308.

SEARASHI, T. et STRAUSS, B. (1965) Biochem. Biophys. Res. Comm., 20, 680.

SEIDEL, H. et CRAMER, F. (1965) Biochim. Biophys. Acta, 108, 367.

SEIFERT, W., NASS, G. et ZILLIG, W. (1968) J. Mol. Biol., 33, 507.

SEVAG, M. G., LACKMAN, D. B. et SMOLENS, J. (1938) J. Biol. Chem., 124, 425.

SINGER, B. et FRAENKEL-CONRAT, H. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 58, 234.

SINGER, B., FRAENKEL-CONRAT, H., GREENBERG, J. et MICHELSON, A. M. (1968) Science, 160, 1235.

STAEHELIN, M. (1964) Biochim. Biophys. Acta, 87, 493.

STAEHELIN, M. (1968) Communication personnelle.

STAEHELIN, M., ROGG, H., BAGULEY, B. C., GINSBERG, T. et WEHRLI, W. (1968) Nature, 219, 1363.

STULBERG, M. P. et ISHAM, K. R. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 57, 1310.

SUEOKA, N., KANO-SUEOKA, T. et GARTLAND, W. J. (1966) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31, 571.

SVEDBERG, T. et PEDERSEN, K. (1940) The Ultracentrifuge, Clarendon Press, Oxford.

SZER, W. et SHUGAR, D. (1960) Acta Biochimica Polonica, 7, 491.

SZER, W. et SHUGAR, D. (1961) Acta Biochimica Polonica, 8, 235.

TAKANASHI (1961) J. Biochem., 49, 1.

TAKANAMI, M. (1967a) J. Mol. Biol., 23, 135.

TAKANAMI, M. (1967b) J. Mol. Biol., 29, 323.

TAKEMURA, S., MIZUTANI, T. et MIYAZAKI, M. (1968) J. Biochem., 63, 274.

THANG, M.N., GUSCHLBAUER, W., ZACHAU, H.G. et GRUNBERG-MANAGO (1967) J. Mol. Biol., 26, 403.

TOMLINSON, R.V. et TENER, G.M. (1962) J. Am. Chem. Soc., 84, 2644.

TOMLINSON, R.V. et TENER, G.M. (1963) Biochemistry, 2, 697.

TSVETKOV, V.N., KISSELEV, L.L., FROLOVA, L.Ju., LIOUBINA, S.Ja., KLENIN, S.I., NIKITINE, N.A. et SKAZKA, V.S. (1964) Biofizika, 9, 257.

UCHIDA, T. et EGAMI, F. (1967) J. Biochem., 61, 44.

VERWOERD, D.W. et ZILLIG, W. (1963) Biochim. Biophys. Acta, 68, 484.

WACKER, A. et EBERT, M. (1959) Z. Naturforsch., 14b, 709.

WAGNER, E.K. et INGRAM, V.M. (1966) Biochemistry, 5, 3019.

WEIL, J.H. (1964) Thèse de Doctorat ès-Sciences, Strasbourg.

WEIL, J.H. et EBEL, J.P. (1961) Biochim. Biophys. Acta, 55, 836.

WEIL, J.H., EBEL, J.P. et MONIER, R. (1962) Nature, 192, 169.

WEIL, J.H., BAKES, J., BEFORT, N. et EBEL, J.P. (1964) Bull. Soc. Chim. Biol., 46, 1073.

WERENNE, J., GROSJEAN, H. et CHANTRENNE, H. (1966) Biochim. Biophys. Acta, 129, 585.

WERENNE, J. et BEFORT, N. (1968) Résultats non publiés.

WIMMER, E., MAXWELL, I.H. et TENER, G.M. (1968) Biochemistry, 7, 2623.

WYATT, G.R. (1951) Biochem. J., 48, 584.

YANIV, M. (1968) Résultats non publiés.

YANIV, M. et BARRELL, B.G. (1968), sous presse.

YARUS, M. et BERG, P. (1967) J. Mol. Biol., 28, 479.

YOSHIDA, H., DUVAL, J. et EBEL, J.P. (1966) C.R. Acad. Sci., série C, 262, 233.

YOSHIDA, H., DUVAL, J. et EBEL, J. P. (1968) Biochim. Biophys. Acta, 161, 13.

YOSHIDA, M. et UKITA, T. (1965a) J. Biochem., 57, 818.

YOSHIDA, M. et UKITA, T. (1965b) J. Biochem., 58, 191.

YOSHIDA, M. et UKITA, T. (1966) Biochim. Biophys. Acta, 123, 214.

YOSHIDA, M. et UKITA, T. (1968) Biochim. Biophys. Acta, 157, 466.

ZACHAU, H. G. (1965) Biochim. Biophys. Acta, 108, 355.

ZACHAU, H. G., DÜTTING, D., FELDMANN, H., MELCHERS, F. et KARAU, W. (1966a) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31, 417.

ZACHAU, H. G., DÜTTING, D. et FELDMANN, H. (1966b) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 347, 212.

ZAKHARYAN, R. A., VENKSTERN, T. V. et BAEV, A. A. (1967) Biokhimiya, 32, 1068.

ZAKHARYAN, R. A., VENKSTERN, T. V. et BAEV, A. A. (1968) Biokhimiya, 33, 111.

ZIFF, E. et FRESCO, J. K. (1967) Abstracts Int. Cong. Biochem., Tokyo, n° 3449.

ABREVIATIONS

DNA	acide désoxyribonucléique
rRNA	acide ribonucléique ribosomal
sRNA	acide ribonucléique soluble
tRNA	acide ribonucléique de transfert
DEAE-cellulose	diéthylaminoéthyl-cellulose
DMF	diméthylformamide
PVS	polyvinylsulfate de potassium
Me_2SO_4	sulfate de méthyle
TEABC	bicarbonate de triéthylammonium
TCA	acide trichloracétique

- Les nucléosides sont représentés par les symboles à une lettre :

A	adénosine	T	ribosylthymine	ψ	pseudouridine
G	guanosine	C	cytidine	diHU	dihydrouridine
I	inosine	U	uridine		

- Les abréviations employées pour les aminoacides sont celles recommandées par l'Union Internationale de Biochimie.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE

TECHNIQUES GENERALES DE PREPARATION ET D'ANALYSE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES 6

CHAPITRE I

PREPARATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES DE LEVURE 6

A. PREPARATION DE L'ACIDE RIBONUCLEIQUE RIBOSOMAL DE LEVURE 6

I. CULTURE DE LA LEVURE 6

II. ACIDE RIBONUCLEIQUE RIBOSOMAL 7

B. ACIDES RIBONUCLEIQUES DE TRANSFERT 7

I. ACIDES RIBONUCLEIQUES DE TRANSFERT TOTAUX . . . 7

II. ACIDE RIBONUCLEIQUE DE TRANSFERT SPECIFIQUE DE LA PHENYLALANINE ($tRNA^{Phe}$) DE LEVURE DE BIERE 8

1) Matériel et Techniques expérimentales 8

a - Matériel 8

b - Distribution en contre-courant 9

c - Récupération des tRNA à partir des fractions du contre-courant 10

d - Préparation des aminoacyl-tRNA synthétases et détermination de la capacité acceptrice des tRNA . . 11

2) Résultats 11

III. DISCUSSION 13

CHAPITRE II

TECHNIQUES GENERALES D'ANALYSE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES 15

A. ANALYSE DES BASES

1) Généralités 15

2) Hydrolyse perchlorique 15

3) Chromatographie 15

B. MESURE DU COEFFICIENT D'ABSORPTION MOLAIRE 17

1) Principe 17

2) Dosage du phosphore 18

a - Minéralisation 19
b - Dosage colorimétrique 19

C. ULTRACENTRIFUGATION 19

1) Centrifugation dans un gradient linéaire de concentration de saccharose 20

2) Ultracentrifugation analytique 21

a - Mesure des constantes de sédimentation 21
b - Distribution des constantes de sédimentation 22

D. CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SEPHADEX G100 22

E. COURBES DE FUSION 23

DEUXIEME PARTIE

ETUDE CHIMIQUE ET PHYSICOCHIMIQUE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES ALCOYLES 25

CHAPITRE III

METHYLATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES 25

A. INTRODUCTION 25

B. METHYLATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES PAR LE SULFATE DE METHYLE EN MILIEU DIMETHYL-FORMAMIDE 28

I. DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE 28

1) Solubilisation des acides nucléiques dans le diméthyl-formamide 28
2) Réaction de méthylation 29
3) Régénération du sel de sodium du RNA 30

II. METHYLATION DES CONSTITUANTS DU RNA 30

1) Analyse des dérivés obtenus 31
2) Stabilité des produits de méthylation 33
3) Recherche de la méthylation du ribose 34

Conclusion 36

III. METHYLATION DES RNA 36

1) Etude chimique 37

a - Nature des dérivés obtenus après hydrolyse des RNA 37
b - Expression des résultats 37
c - Influence de la durée de réaction 39
d - Influence de la quantité de sulfate de méthyle . . . 39

2) Etude physicochimique 42
a - Spectres d'absorption UV des RNA méthylés 42
b - Coefficient d'absorption molaire ε (P) 42
c - Intégrité de la structure des rRNA 42
Centrifugation en gradient de saccharose 42
Ultracentrifugation analytique 45
Conclusion 50

d - Intégrité de la structure des tRNA 50
Structure primaire 50
Structure secondaire 50

C. METHYLATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES PAR LE SULFATE DE METHYLE EN SOLUTION AQUEUSE 52

I. DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE 52

II. ETUDE CHIMIQUE 53

1) Nature des dérivés obtenus 53
2) Influence de la durée de la réaction 53
3) Influence de la température 53
4) Influence de la quantité de sulfate de méthyle par nucléotide dans le milieu réactionnel 55
5) Méthylation des bases et nucléosides mineurs des tRNA 57

III. ETUDE PHYSICOCHIMIQUE 57

1) Spectres d'absorption UV et ξ (P) des RNA méthylés en solution aqueuse 57
2) Intégrité de la structure primaire des rRNA 59
3) Intégrité de la structure primaire des tRNA 59
4) Structure secondaire des tRNA 59
a - Etude de la courbe de fusion des tRNA dans l'acétate de potassium 0,4 M 59
b - Influence de la méthylation sur les courbes de fusion des tRNA méthylés en solution aqueuse 60

D. DISCUSSION 63

Nature et taux des bases méthylées 63
Production de coupures dans la chaîne polynucléotidique au cours de la méthylation 65
Déstabilisation de la structure secondaire sous l'influence de la méthylation 68

E. CONCLUSION 70

CHAPITRE IV

ALLYLATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES 72

INTRODUCTION 72

PARTIE EXPERIMENTALE 73

A. REACTIF D'ALLYLATION 73

B. ALLYLATION DES RIBONUCLEOSIDES 76

I. ALLYLATION DES RIBONUCLEOSIDES EN MILIEU DIMETHYLFORMAMIDE 76

1) Adénosine 76
2) Guanosine 76
3) Cytidine 77
4) Uridine 79
5) Nucléosides et bases mineurs 79
6) Recherche de l'allylation du ribose 80

II. ESSAIS D'ALLYLATION DES RIBONUCLEOSIDES EN MILIEU AQUEUX 80

C. ALLYLATION, EN MILIEU DMF, DE DINUCLEOSIDES-PHOSPHATES DU TYPE GpX 80

I. CONDITIONS EXPERIMENTALES 80

II. ANALYSE DES PRODUITS DE REACTION 81

III. STABILITE DE LA LIAISON PHOSPHODIESTER 81

D. ALLYLATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES 82

I. ALLYLATION DES RNA EN MILIEU DIMETHYLFORMAMIDE 82

1) Description de la technique 82
2) Etude chimique des RNA allylés 82
a - Nature des dérivés obtenus 82
b - Expression des résultats 83
c - Influence de la quantité de bromure d'allyle ajoutée par nucléotide dans le milieu réactionnel 83
d - Influence de la température sur l'allylation 85
e - Influence de la durée de réaction 86
f - Essais d'amélioration du taux d'allylation par déshydratation de la solution organique de RNA 86

3) Etude physicochimique des RNA allylés 87

a - Caractéristiques spectrales des RNA allylés et coefficients d'absorption molaire 87
b - Intégrité moléculaire des RNA allylés 89
RNA ribosomal 89
RNA de transfert 89
c - Structure secondaire des tRNA allylés 93

II. ESSAIS D'ALLYLATION DES RNA EN MILIEU AQUEUX . 93

III. ALLYLATION DE tRNA EN MILIEU AQUEUX EN PRESENCE DE DIMETHYLFORMAMIDE 93

E. DISCUSSION 95

F. CONCLUSION 99

TROISIEME PARTIE

APPLICATION DES REACTIONS D'ALCOYLATION A L'ETUDE DE LA STRUCTURE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES 101

INTRODUCTION 101

CHAPITRE V

APPLICATION DES REACTIONS DE METHYLATION ET D'ALLYLATION A LA DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES : Etude de l'action de la ribonucléase T_1 sur les acides ribonucléiques alcoylés 102

INTRODUCTION 102

- PRINCIPES GENERAUX DE LA DETERMINATION DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES 102
- GENERALITES SUR LA RIBONUCLEASE T_1 104
- OBJET DU TRAVAIL 105

PARTIE EXPERIMENTALE 107

I. PRODUITS EMPLOYES 107

II. MODIFICATIONS CHIMIQUES 107

III. METHODES ANALYTIQUES 107

IV. MISE AU POINT DES CONDITIONS EXPERIMENTALES D'HYDROLYSE ENZYMATIQUE 108

1) Action de la phosphatase alcaline d'E. coli 108
2) Action conjuguée de la ribonucléase T_1 et de la phosphatase alcaline d'E. coli 110
- Technique 1 110
- Technique 2 111

V. RESULTATS 112

1) Influence de l'allylation de la guanine sur l'activité de la ribonucléase T_1 112

a - Action de la ribonucléase T_1 sur les guanylyl-(3'-5'-)nucléosides en fonction du taux d'allylation de la guanine 112
b - Action de la ribonucléase T_1 sur le tRNA en fonction de l'allylation de la guanine 114
c - Influence de la méthylation de la guanine sur l'activité de la ribonucléase T_1 116

DISCUSSION 117

CHAPITRE VI

APPLICATION DE LA REACTION DE METHYLATION A LA DETERMINATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE ET TERTIAIRE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES DE TRANSFERT : Détermination des sites accessibles à la méthylation dans le $tRNA^{Phe}$ de levure 119

INTRODUCTION 119

- Objet du travail 122

I. TECHNIQUES EXPERIMENTALES 123

1) Produits employés 123
2) Techniques de méthylation par le sulfate de méthyle radioactif 123

3) Analyse du tRNA méthylé 124
4) Hydrolyse par la ribonucléase T_1 124
5) Chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose des oligonucléotides obtenus après action de la ribonucléase T_1 125
a - Préparation de la DEAE-cellulose 125
b - Préparation de la colonne 126
c - Elution de la colonne 126
d - Détermination des résultats 127
6) Analyse des fractions recueillies 127
a - Dessalage 127
b - Analyse des fractions dessalées 128
c - Recherche du dihydrouracile 129

II. RESULTATS 130
1) Influence de la concentration de Mg^{++} sur la méthylation du $tRNA^{Phe}$ 130
2) Comparaison du profil de fractionnement chromatographique des oligonucléotides obtenus par action de la ribonucléase T_1 sur les $tRNA^{Phe}$ de levure de boulangerie et de levure de bière 132
3) Etude du profil de fractionnement des oligonucléotides obtenus après action de la ribonucléase T_1 sur un $tRNA^{Phe}$ partiellement méthylé 137
a - Etude de l'action du sulfate de méthyle non radioactif 139
b - Etude de l'action du sulfate de méthyle radioactif. 142

DISCUSSION 149

QUATRIEME PARTIE

APPLICATION DES REACTIONS D'ALCOYLATION DES RNA A L'ETUDE DES ACTIVITES BIOLOGIQUES 153

CHAPITRE VII

INFLUENCE DE L'ALCOYLATION SUR LA CAPACITE ACCEPTRICE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES DE TRANSFERT 153

INTRODUCTION 153

A. MATERIEL ET METHODES 158

I. PRODUITS EMPLOYES 158

II. TECHNIQUE DE FIXATION DES AMINOACIDES SUR LES tRNA 159

1) Préparation des aminoacyl-tRNA synthétases 159
a - Culture de la levure 159
b - Broyage des cellules et préparation du surnageant 105 000 g 160
c - Elimination des aminoacides froids 160
d - Elimination des tRNA contenus dans la préparation par chromatographie sur DEAE-cellulose . . . 160
e - Dosage de la préparation enzymatique 161
f - Conservation de l'enzyme 161

2) Composition du milieu réactionnel pour le test de fixation 161
3) Lavage et détermination de la radioactivité 162

B. RESULTATS ET DISCUSSION 163

I. INFLUENCE DE LA METHYLATION SUR LA CAPACITE ACCEPTRICE DES tRNA 163

II. INFLUENCE DE L'ALLYLATION SUR LA CAPACITE ACCEPTRICE DU tRNA 166

CONCLUSION 171

CHAPITRE VIII

INHIBITION DE LA MULTIPLICATION VIRALE A L'AIDE D'ACIDES RIBONUCLEIQUES ALCOYLES 173

INTRODUCTION 173

A. TECHNIQUES 174

I. TECHNIQUES VIROLOGIQUES 174

II. PREPARATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES 174
1) Acide ribonucléique de levure 174
2) Acide ribonucléique cytoplasmique du cortex rénal de veau 175
3) Acide ribonucléique d'embryon de poulet 176
III. TECHNIQUES D'ALCOYLATION 176
1) Méthylation 176
2) Allylation 177

B. RESULTATS 177

I. INHIBITION DE LA MULTIPLICATION DE MIXOVIRUS PARAINFLUENZAE (VIRUS SENDAÏ) SUR CELLULES DE REIN DE VEAU 177
1) Action de l'acide ribonucléique homologue sur la multiplication virale 177
2) Action d'un acide ribonucléique hétérologue 178
3) Action d'un acide ribonucléique ribosomal hétérologue méthylé 179
4) Action de l'acide ribonucléique homologue méthylé 179
II. INHIBITION DE LA MULTIPLICATION D'UN ARBOVIRUS (VIRUS SINDBIS) SUR FIBROBLASTES D'EMBRYON DE POULET 179
1) Action de l'acide ribonucléique homologue 179
2) Action d'un acide ribonucléique hétérologue 179
3) Action d'un acide ribonucléique hétérologue méthylé . . . 181
4) Action de l'acide ribonucléique total homologue méthylé . 181
5) Action de différentes fractions de l'acide ribonucléique homologue méthylé 181
6) Action de la 7-méthylguanine 181
7) Action de l'acide ribonucléique homologue allylé 182

C. DISCUSSION 182

RESUME ET CONCLUSION 185
BIBLIOGRAPHIE 191
ABREVIATIONS
TABLE DES MATIERES